

**Dynamische Aspekte der Kernarchitektur:
S/MARs und ihre Rolle bei der
Etablierung aktiver Transkriptionseinheiten**

**Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig**

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Silke Winkelmann
aus Stadthagen

1. Referent:	Prof. Dr. J. Bode
2. Referent:	Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel
eingereicht am:	14.03.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am:	18.06.2007
Druckjahr:	2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Goetze, S., Baer, A., Winkelmann, S., Nehlsen, K., Seibler, J., Maass, K., & Bode, J. (2005). Performance of Genomic Bordering Elements at Predefined Genomic Loci. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 25, No. 6, 2260–2272.

Vidaković, M., Koester, M., Goetze, S., Winkelmann, S., Klar, M., Poznanović, G., & Bode, J. (2005). Colocalization of PARP-1 and Lamin B in the nuclear architecture: A HALO-Fluorescence- and Confocal-Microscopy Study *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 96, 3555-3568.

Bode, J., Winkelmann, S., Götz, S., Spiker, S., Tsutsui, K., Bi, C., AK, P. & Benham, C. (2006). Correlation between Scaffold/Matrix Attachment Region (S/MAR) Binding Activity and DNA Duplex Destabilization Energy. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 358, 597-613

Winkelmann, S., Klar, M., Benham, C., AK, P., Goetze, S., Gluch, A., & Bode, J. (2006). The positive aspects of stress: Strain Initiates Domain Decondensation (SIDD). *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, Vol. 5, 24-31

Tagungsbeiträge

S. Goetze, S. Winkelmann, Y. Huesemann, K. Nehlsen, C. Benham & J. Bode. Higher Order Chromatin Organization: Nuclear Positioning and Gene (dys)Regulation. *1st Symposium of TransRegio 5*, 9.-11. Oktober 2003, München

S. Goetze, Y. Huesemann, S. Winkelmann, C. Benham & J. Bode. Computational and in vitro analysis of destabilized DNA regions in the human and mouse genome: fundamental principles of gene (dys)regulation. 25.-26. August 2003, Bonn

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	v
1. Einleitung.....	6
1.1. Der Zellkern.....	6
1.1.1. Die strukturelle Organisation eukaryotischer DNA.....	7
1.1.2. Die Subkompartimentierung des Zellkerns.....	8
1.2. Die Kernmatrix	10
1.2.1. Kernmatrix-assoziierte DNA-Bereiche.....	11
1.2.2. S/MAR assoziierte Proteine.....	14
1.2.3. Der S/MAR-Bindungsassay.....	15
1.2.4. Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	16
1.3. Computergestützte Vorhersagen von S/MAR-Elementen.....	17
1.3.1. <i>Stress-Induced Duplex Destabilization</i> – Das SIDD-Profil.....	18
1.3.2. Der MAR-Finder oder „MAR-Wiz“	19
1.4. Chromatindomänen und Transgen-Integration.....	19
1.5. Interferone.....	20
1.5.1. Die Typ I Interferone.....	21
1.5.2. Vergleich von Typ I Interferonen.....	21
1.5.3. S/MAR-Elemente im humanen Typ I Interferon-Gencluster.....	22
1.6. Aufgabenstellung.....	23
2. Ergebnisse.....	24
2.1. Grenzstrukturen und ihre Matrix-Assoziation.....	26
2.1.1. FISH Analysen zur Matrixassoziation von Grenzstrukturen.....	28
2.1.2. Biomathematische Analysen zur Matrixassoziation von Grenzstrukturen.....	32
2.1.3. Biomathematische Analysen zur Matrixassoziation von artifiziellen S/MAR Elementen.....	35
2.2. S/MARs innerhalb des IFN-Genclusters.....	36
2.3. S/MARs innerhalb der Zellkernorganisation.....	43
2.4. S/MARs als Integrationsort für Viren.....	47

3. Diskussion.....	51
3.1. Grenzstrukturen und ihre Matrix-Assoziation.....	51
Bindungsmodell von S/MARs und cHS4.....	52
Matrixassoziation von artifiziellen S/MAR Elementen.....	53
3.2. S/MARs innerhalb des IFN-Genclusters.....	54
3.3. S/MARs innerhalb der Zellkernorganisation.....	55
2.4. S/MARs als Integrationsort für Viren.....	57
2.5. Ausblick.....	59
4. Material & Methoden.....	60
4.1. Geräte.....	60
4.2. Material.....	60
4.2.1. Chemikalien.....	60
4.2.2. Zellkulturmaterialien.....	61
4.2.3. Zelllinien.....	61
4.2.4. Bakterienstämme (<i>E. coli</i>).....	61
4.2.5. Enzyme.....	61
4.2.6. Plasmidvektoren.....	61
4.2.7. Oligonukleotide.....	62
4.2.8. Antikörper (Primär).....	64
4.2.9. Computerprogramme.....	64
4.3. Allgemeine Grundtechniken.....	64
4.3.1. Sterilisieren.....	64
4.3.2. Fällern von Nukleinsäuren.....	64
4.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	65
4.4. Methoden zur DNA-Präparation.....	65
4.4.1. Präparation von Plasmid-DNA – Minipräparation.....	65
4.4.2. Präparation von Plasmid-DNA – Maxipräparation.....	65
4.4.3. Präparation von Cosmid- und BAC-DNA.....	66
4.4.4. Präparation von genomischer DNA (HMW).....	66
4.4.5. DNA-Rückgewinnung aus Agarosegelen.....	67
4.4.6. Gewinnung von Kompetitor-DNA aus <i>E. coli</i>	67
4.5. Modifikation und Analyse von Nukleinsäuren.....	67
4.5.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	67

4.5.2. Auffüllen von 5'-überstehenden Enden.....	68
4.5.3. Dephosphorylierung.....	68
4.5.4. T4-Kinase-Reaktion.....	68
4.5.5. Ligation von DNA-Fragmenten.....	68
4.6. Gelelektrophorese.....	69
4.6.1. Agarosegele.....	69
4.6.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	69
4.7. Polymerase Ketten Reaktion (RCR).....	70
7.7.1. Standard-PCR.....	70
7.7.2. Sequenzier-PCR.....	72
7.7.3. <i>Real-time</i> Quantitative PCR.....	72
4.8. <i>Blotting</i>	73
4.8.1. <i>Southern Blotting</i>	73
4.8.2. <i>Western Blotting</i>	73
4.9. RNA.....	74
4.9.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen.....	74
4.9.2. Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	75
4.10. Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen.....	75
4.10.1. Medien und Lösungen.....	75
4.10.2. Kultivierung von Zelllinien.....	76
4.10.3. Passagieren.....	76
4.10.4. Langzeitlagerung von Zellen.....	76
4.10.5. Virusinduktion	76
4.10.6. Interferon Test	77
4.10.7. <i>Metaphasespreads</i>	77
4.11. Arbeiten mit <i>E. coli</i>	78
4.11.1. Kultivierung von Bakterien.....	78
4.11.2. Herstellung kompetenter Bakterien.....	78
4.11.3. (Elektro-)Transformation von <i>E.coli</i>	78
4.11.4. Anlage von Glycerinkulturen.....	79
4.12. Methoden zur Kernmatrixpräparation (<i>scaffold preparation</i>).....	79
4.12.1. Die Lithium-3,5-diiodosalicylat(LIS)-Extraktionsmethode.....	79
4.12.2. Die modifizierte Hochsalzextraktionsmethode.....	80
4.12.3. Reassoziationsexperimente.....	81

4.12.4. Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente.....	81
4.13 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	82
4.13.1. Herstellung der DNA-Sonden mittels Nick-Translation.....	82
4.13.2. <i>In situ</i> Hybridisierung.....	82
4.13.3. Detektionssysteme für <i>in situ</i> Hybridisierungen.....	83
4.13.4. Immunofärbung.....	83
4.13.5. Mikroskopische Auswertung der <i>in situ</i> Hybridisierungen.....	84
5. Abkürzungen & Zeichen.....	84
6. Literatur.....	87
7. Danksagung.....	101
8. Lebenslauf.....	102

Zusammenfassung

Das Genom eukaryotischer Organismen unterliegt einer strikten Organisation, die eine effektive Regulation zellspezifischer Genexpression ermöglicht. S/MAR-Elemente sind die strukturellen Komponenten der DNA, die das Genom in unabhängig regulierbare Domänen gliedern und sowohl geregelte Replikation als auch gewebespezifische Expression ermöglichen. S/MARs erzielen diese Funktion offenbar durch Anheftung der DNA an die Kernmatrix - eine Funktion, die durch spezifische Struktureigenschaften determiniert wird. Hierbei kommt ihrer hohen Tendenz zur Ausbildung einzelsträngiger Bereiche besondere Bedeutung zu. Diese Eigenschaft liegt dem SIDD-Profil zugrunde, das gegenwärtig zur Vorhersage von S/MARs aus Sequenzdaten entwickelt wird. In der vorliegenden Arbeit standen Analysen zur Chromatinstruktur von S/MAR-Elementen im Mittelpunkt.

Ein Ziel dieser Promotionsarbeit war, S/MAR-Elemente *in vitro* und *in situ* umfassend zu analysieren und zu charakterisieren. Im Zuge der Genomprojekte zielten bisherige wissenschaftliche Arbeiten häufig auf die Analyse von kodierenden DNA-Regionen. Im Fokus dieser Arbeit steht hingegen die Analyse der intergenischen Bereiche vor allem im Bereich des Interferon-Genclusters im Vergleich zwischen Mensch und Maus und Schimpanse. S/MAR-Elemente wurden identifiziert und ihre Kernmatrix-Bindungseigenschaften miteinander verglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche S/MAR Konstrukte mit einem Duplex-Insulator-Konstrukt an fünf verschiedenen definierten genomischen Integrationsorten miteinander verglichen. Ein neues Verfahren, um DNA-Kernmatrix Interaktionen *in situ* beobachten zu können, ist die Halo-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Halo-FISH). Der Assoziationsstatus von Genen an der Kernmatrix kann Aufschluss über die transkriptionelle Aktivität geben. Deswegen sollte unter anderem der transkriptionell aktive Zustand von o.g. Klonen untersucht werden.

Der Integrationsmechanismus von Retroviren wird mit der Kernarchitektur in Zusammenhang gebracht, die ihrerseits die Transkriptionseigenschaften der Proviren determiniert.

1. Einleitung

1.1. Der Zellkern

Man unterscheidet in der Biologie zwischen den kernlosen Zellen der Prokaryoten und den kernhaltigen Zellen der Eukaryoten. Ein charakteristisches Merkmal der eukaryotischen Zelle ist die Kompartimentierung des komplexen biochemischen Stoffwechselgeschehens. Dies wird erreicht, indem verwandte Stoffwechselreaktionen in räumlich abgegrenzten Reaktionsräumen, den Organellen, ablaufen. Zu den membranumhüllten Organellen zählen z.B. die Mitochondrien, in denen durch oxidativen Abbau von Nahrungsstoffen ATP erzeugt wird, oder das Endoplasmatische Reticulum, welches für den Transport von Lipiden und Membranproteinen zuständig ist (De Duve, 1983).

Der Zellkern stellt mit einem Durchmesser von 10 µm das größte, lichtmikroskopisch sichtbare Organell der eukaryotischen Zelle dar. Er enthält den Großteil des Genoms und dient vor allem dem Nukleinsäure-Metabolismus. Hier findet die Speicherung, Replikation, Expression, Reparatur und Rekombination genetischer Information statt.

Gegen den übrigen Raum der Zelle ist der Zellkern durch eine Hülle abgegrenzt, die aus einer äußeren und inneren Kernmembran besteht. Die beiden Kernmembranen sind durch einen perinucleären Spalt voneinander getrennt. Die äußere Kernmembran ist häufig mit Ribosomen besetzt und geht in das raue Endoplasmatische Reticulum über. Zudem ist der Zellkern auf der zytoplasmatischen Seite von Intermediärfilamenten umgeben, die ihn mit dem Zytoskelett verbinden und ihn beweglich lagern. Die Innenseite der Kernhülle wird durch ein polymorphes Netzwerk, die Kernlamina, gestützt. Dieses Netzwerk besteht je nach Organismus und Zelltyp aus einem bis fünf verschiedenen Proteinen. Diese als Lamine bezeichneten Proteine sind mit den Bausteinen der Intermediärfilamente verwandt (Aebi *et al.*, 1986) und spielen neben ihrer Funktion als strukturgebende Komponenten auch eine Rolle bei der Kernteilung, wo sie den Ab- und Aufbau der Kernhülle regulieren (Gerace & Burke, 1988). Durch aktiven Transport oder Diffusion findet ein Austausch von Makromolekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Kerninneren statt und wird mit den in die Membranen eingelagerten Kernporen reguliert (Görlich & Mattaj, 1996).

Der Zellkern bietet Schutz für das eukaryotische Chromatin und grenzt den Nukleinsäure-Metabolismus von den Stoffwechselreaktionen und der Proteinbiosynthese im Zytoplasma ab. Während bei Prokaryoten das primäre Transkriptionsprodukt ohne weitere Modifikationen für die Proteinbiosynthese genutzt werden kann, also eine direkte Kopplung von Transkription und Translation erfolgt, sind die Verhältnisse bei den Eukaryoten wesentlich komplizierter. Eukaryotische Gene setzen sich aus proteinkodierenden Exons und nichtkodierenden Introns zusammen (Witkowski, 1988). Diese komplexe Struktur der Gene erfordert ein Prozessieren des Primärtranskripts, bei dem die nichtkodierenden Abschnitte aus der prä-mRNA herausgeschnitten werden. Das Entfernen der Introns und das anschließende Verknüpfen der Exons bezeichnet man als Spleißen. Nach diesem Vorgang wird die fertig prozessierte mRNA in das Zytoplasma transportiert und kann an den Ribosomen translatiert werden.

1.1.1. Die strukturelle Organisation eukaryotischer DNA

Im Zellkern von Eukaryoten ist die DNA zusammen mit RNA und Proteinen äußerst dicht verpackt. Es erfordert ein hohes Maß an struktureller und funktioneller Organisation innerhalb des Zellkerns, damit genetische Prozesse reguliert ablaufen können. Dabei muss sowohl ein Zugriff auf aktive Gene, Replikationsstartpunkte und regulatorische Sequenzen möglich sein, als auch eine Kompaktierung des langen DNA-Fadens erreicht werden. Die DNA liegt im eukaryotischen Interphase-Zellkern im Komplex mit Proteinen vor. Diese Nukleoprotein-Komplexe mit einem DNA-Anteil von etwa 30% bezeichnet man als Chromatin, welches, wie in Abb. 1.1. dargestellt, die erste Stufe der DNA-Organisation bildet. Die Proteine des Chromatins teilt man in Histone und Nichthiston-Proteine ein. Histone sind kleine basische Proteine die direkt mit der DNA assoziiert sind. Ihre basischen Aminosäuren neutralisieren die negativ geladenen Phosphat-Gruppen der DNA und ermöglichen so, in regulierbarer Form, eine dichte Verpackung der DNA im Zellkern (Wolffe, 1992).

Je zwei Kern-Histon-Moleküle der Typen H2A, H2B, H3 und H4 bilden den sogenannten Nukleosomenkern mit einem Durchmesser von 10 nm, um den 146 bp der DNA in 1,8 Windungen gewickelt sind. Die Nukleosomenkerne liegen, abhängig von Zelltyp und Organismus, in einem Abstand von 165 bp bis 220 bp auf der DNA. Dieser Abstand erklärt sich durch „linker“-DNA. Durch Bindung eines weiteren Histons vom Typ H1 wird die nächsthöhere Organisati-

onsstufe erreicht. Histon H1 bedeckt etwa 20 bp der „linker“-DNA und unterstützt die Ausbildung spiralig gewundener Überstrukturen mit einem Durchmesser von 30 nm, sogenannter Solenoide (Richmond & Davey, 2003). Diese 30 nm-Faser (siehe Abb.1.1.) ist nach heutigen Vorstellungen an definierten DNA-Bereichen mit einem komplexen Gerüst aus Nicht-Histon-Proteinen und RNA im Zellkern verankert (s. 1.2.1. Kernmatrix-assoziierte DNA-Bereiche).

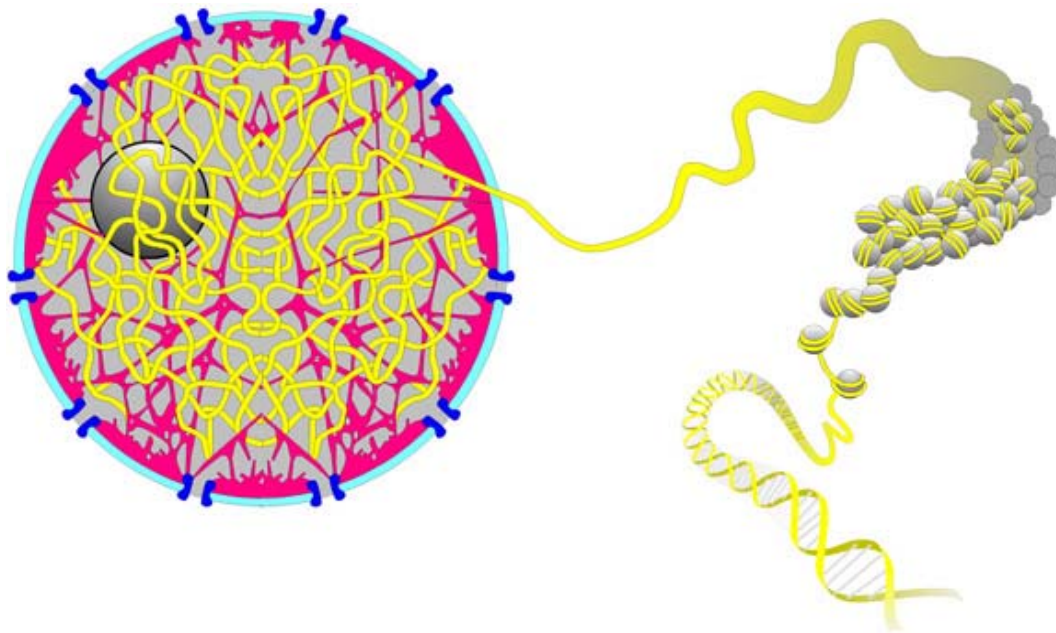


Abb.1.1.: Verpackungsstufen der DNA im Zellkern. Die DNA-Doppelhelix windet sich in der „Perlenkettenform“ um Histon-Oktamere und bildet eine 10 nm Chromatin Faser. Diese kondensiert zur 30 nm Faser (Solenoid Struktur), welche in Chromosomalen Schlaufen angeordnet ist. In kondensierter Form liegen die Schlaufen im Zellkern und bilden die höchste Verpackungsform. In einem Mitosechromosom gepackt, liegt jedes DNA-Molekül 50.000 mal kürzer als in der Ausgangsform vor.

1.1.2. Die Subkompartimentierung des Zellkerns

Die Komplexität der im Zellkern ablaufenden Prozesse des Nukleinsäure-Metabolismus legt eine Einteilung des Zellkerns in funktionelle Bereiche nahe (siehe Abb.1.2.). Schon der bei lichtmikroskopischer Betrachtung sichtbare Nukleolus, in dem rRNA-Synthese und Ribosomenzusammenbau stattfinden, weist morphologisch unterscheidbare Bereiche mit spezifischen Aktivitäten auf (Scheer & Weisenberger, 1994).

Auch das Chromatin liegt nicht einheitlich im Zellkern verteilt vor. Man unterscheidet zwischen dem zumeist am Rand des Kerns gelegenen Heterochromatin und dem Euchromatin in der Mitte des Kerns. Diese Bereiche stellen

unterschiedliche Packungsdichten des Chromatins dar. Die aktive Transkription von Genen findet hauptsächlich im Euchromatin statt. Mit der Entwicklung neuer Methoden konnten in den letzten Jahren interessante Erkenntnisse über den Aufbau des Zellkerns gewonnen werden. Es wurde deutlich, dass das Innere des Zellkerns in mehrere, voneinander getrennte Subkompartimente aufgeteilt ist, welche die verschiedenen Reaktionsvorgänge räumlich voneinander trennen. So nimmt z.B. jedes Chromosom ein seinem DNA-Gehalt entsprechend großes Territorium ein, das sich nicht mit anderen Chromosomen-Territorien überschneidet (Lichter *et al.*, 1988).

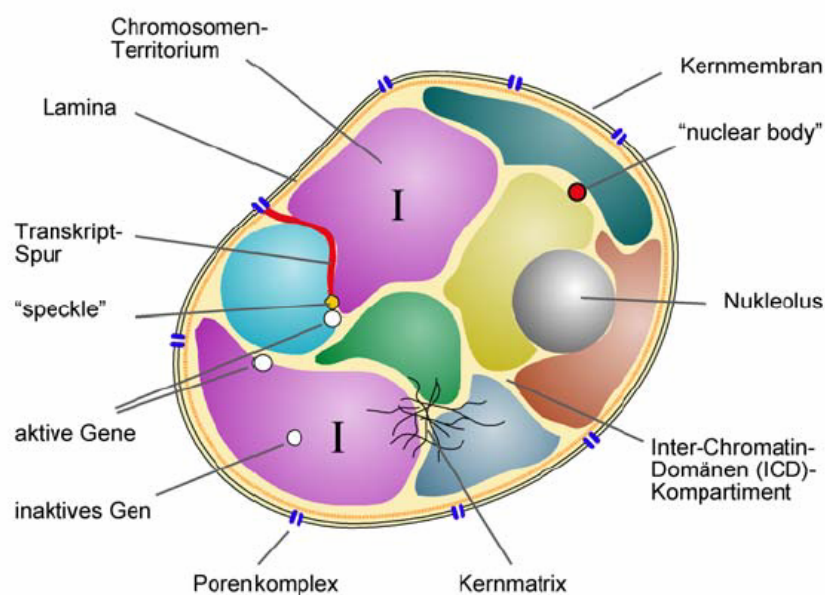


Abb.1.2.: Aufbau des Zellkerns Der Zellkern ist ein mosaikartig zusammengesetztes Organell, das durch eine Kernhülle vom Zytoplasma abgetrennt ist. Im Inneren ist der Zellkern in zahlreiche strukturell und funktionell getrennte Bereiche (Kompartimente) unterteilt. Die größten Strukturen sind die Chromosomen-Territorien (hier als verschiedenfarbige „Inseln“ dargestellt), die durch einen chromatinfreien Bereich voneinander getrennt sind. In diesen als Inter-Chromatindomänen-Kompartiment (ICD) bezeichneten Bereich sind zahlreiche funktionelle „Kernkörperchen“ („*nuclear bodies*“) eingebettet, an denen die meisten Reaktionen der Gen-Expression, der RNA-Reifung und der Genom-Replikation ablaufen (aus Fackelmayer, 2000).

Mit modernen Markierungsmethoden kann man sogar zeigen, dass diese Territorien kein homogenes Muster aufweisen, sondern aus globulären Unterstrukturen zusammengesetzt sind, den sogenannten subchromosomalen Foci. Die Lage der Chromosomen-Territorien variiert von Zelle zu Zelle, allerdings scheinen die Territorien nicht zufällig im Zellkern verteilt zu sein. Mit Ausnahme von Hefe geht man heute davon aus, dass das Heterochromatin mit seinen genetisch inaktiven chromosomalen Regionen in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert ist. Die traditionelle Modellvorstellung, dass aktive Gene an der

Peripherie, und nicht-kodierende Sequenzen der DNA im Zentrum der Chromosomen-Territorien liegen (Kurz *et al.*, 1996; Cremer & Cremer, 2001), wird im Moment kontrovers diskutiert (vgl. Mahy *et al.*, 2002). Zwischen den Territorien befindet sich ein DNA-freier Raum, welcher als Inter-Chromatin-Domänen-Kompartiment (ICD-Kompartiment) bezeichnet wird (Bridger *et al.*, 1998). Es handelt sich dabei um eine Art Kanalsystem, das die Chromosomen-Territorien umspannt und teilweise durchzieht. Das ICD-Kompartiment scheint eine wichtige Rolle beim Transport von Makromolekülen innerhalb des Zellkerns zu spielen. Untersuchungen mit RNA-Hybridisierungen zeigen, dass neu synthetisierte RNA direkt in das ICD-Kompartiment abgegeben wird. Verfolgt man nun den Weg dieser RNA, so zeigen sich Spuren („*RNA-Tracks*“), die auf dem kürzesten Weg vom Ort der Transkription zur Peripherie des Zellkerns und der Kernporen weisen (Lawrence *et al.*, 1989). Der Zellkern ist also in viele abgegrenzte Gebiete unterteilt, in denen spezielle Prozesse wie DNA-Replikation, Transkription oder RNA-Prozessierung stattfinden. Allerdings besteht hier ein großer Unterschied zur Kompartimentierung im Zytoplasma. Anders als bei den Organellen, deren Reaktionsräume durch Membranen abgegrenzt sind, findet im Zellkern eine Komplexierung biochemischer Vorgänge nur durch spezifische Wechselwirkungen von strukturgebenden Komponenten, Enzymen und Substraten statt. So dienen z.B. die fleckenförmigen „*speckles*“ als Speicherort für Spleiß-Komponenten. Andere fleckenförmige Strukturen des Zellkerns, denen man noch keine eindeutige Funktion zuordnen kann, werden kollektiv als „*nuclear bodies*“ bezeichnet. Die Aufklärung ihrer Funktionen wird die Zellbiologen noch einige Jahre beschäftigen.

1.2. Die Kernmatrix

Der Zellkern ist das am dichtesten gepackte Organell der Zelle. Die große Menge an DNA, RNA und Proteinen verhindert oft einen Einblick sowohl in die strukturelle Organisation, als auch in die funktionellen genetischen Vorgänge innerhalb des Zellkerns. Es wurden daher Methoden entwickelt, um das (unter bestimmten Bedingungen) unlösliche Proteingerüst des Zellkerns zu isolieren, dessen Wechselwirkung mit Chromatin *in vitro* zu untersuchen und Informationen über seine Dynamik zu erarbeiten.

Die ersten Experimente, bei denen Zellkerne mit Hochsalz-Lösungen extrahiert wurden, fanden bereits um 1950 statt (Zbarskii & Debov, 1951).

Die Bezeichnung „Kernmatrix“ bzw. „Kerngerüst“ (abhängig von der Extraktionsmethode: Berezney & Coffey, 1974: *nuclear matrix*; Paulson & Laemmli 1977: *nuclear scaffold*) wurde aber erst im Jahr 1974 von Berezney und Coffey eingeführt und die Extraktionsmethode wurde von Cockerill und Garrard (1986) weiterentwickelt. Dabei werden Zellkerne zunächst mit einer DNA-spezifischen Endonuklease (DNase I) inkubiert, anschließend wird mit 2M NaCl (Hochsalz) ein Großteil der Proteine, darunter die Histone, extrahiert. Zur Struktur der Kernmatrix, die zu 98 % aus Proteinen besteht, gehören unter anderem die Lamina mit den integrierten Kernporenkomplexen, bestimmte Teile der Nukleoli, sowie ein dreidimensionales Netzwerk aus typischerweise 10 nm dicken Fasern. Die Protein-Zusammensetzung der Kernmatrix hängt sehr stark von der Präparationsmethode ab (Cook, 1988). Präpariert man die Kernmatrix unter schonenden Bedingungen ohne abschließende Hochsalzextraktion, so beobachtet man 20-50 nm dicke polymorphe Fasern, an denen Proteinkomplexe angelagert sind (He *et al.*, 1990). Man geht davon aus, dass diese Proteinkomplexe molekulare „Fabriken“ der DNA-Replikation („replication factories“) oder Transkription („transcription factories“) sind (Hassan & Cook, 1993; Hozak *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 1993). Diese Proteinkomplexe und andere angeheftete Proteine können durch weitere biochemische Schritte entfernt werden. Übrig bleibt ein Netzwerk von Fasern mit 2-3 nm Durchmesser, welches hauptsächlich aus heterogener nukleärer RNA (hnRNA) und Proteinen besteht. Entfernt man die RNA mit RNase, so wird das Fasergeflecht zerstört und die Chromosomenterritorien lösen sich auf (Ma *et al.*, 1999). Behandelt man Zellen mit Transkriptionshemmstoffen, so führt dies zum Zusammenbruch der Kernmatrix, was auf eine direkte Korrelation von Transkription und Kernmatrix hinweist (Fey *et al.*, 1988; Nickerson *et al.*, 1989). Die RNA hat also vermutlich eine strukturgebende Funktion bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Kernmatrix, und scheint somit an der Organisation des Genoms in Chromosomen-Territorien beteiligt zu sein.

1.2.1. Kernmatrix-assoziierte DNA-Bereiche

Eine weit verbreitete Modellvorstellung geht davon aus, dass die 30 nm-Fasern des Chromatins im Interphasekern schleifenartig organisiert sind (s. Abb.1.3.). Diese Schleifen sind 20000 bis 80000 bp lang (Gasser *et al.*, 1989) und stellen *in vivo* vermutlich jeweils eine unabhängige funktionelle Einheit dar (Goldman, 1988). An ihrer Basis sind sie über bestimmte DNA-Sequenzen mit

der Kernmatrix verbunden die man je nach Isolierungsmethode als SARs (*scaffold attachment regions*) oder MARs (*matrix attachment regions*) bezeichnet. Typische S/MAR-Elemente weisen eine ungewöhnlich hohe Zahl an AT-Basenpaaren auf, insbesondere von längeren, ununterbrochenen Oligo-(dA)- oder Oligo-(dT)-Folgen. Außerdem findet man in den AT-reichen Abschnitten überdurchschnittlich oft Topoisomerase II-Schnittstellen und autonom replizierende Sequenzen. S/MAR-Elemente besitzen eine Länge von etwa 200 bis 3000 bp und befinden sich meist außerhalb des codierenden Bereichs von Genen. Sie kommen im Genom als Einzelsequenzen vor und weisen nach dem heutigen Stand der Forschung keinen Konsensus auf. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine S/MAR-Erkennungssignatur (MRS), bestehend aus zwei kurzen, dicht hintereinanderliegenden DNA-Sequenzen (8 bp und 16 bp lang), in 80 % aller bekannten S/MARs vorhanden ist (van Drunen *et al.*, 1999). Dies deutet daraufhin, dass es zwei verschiedene Klassen von S/MAR-Elementen gibt: S/MARs mit und ohne MRS.

S/MAR-Elemente werden artüberschreitend erkannt, was für eine essentielle Funktion in eukaryotischen Zellen spricht. Häufig flankieren S/MAR-Elemente transkribierte Gene oder Gengruppen und liegen nahe von regulatorischen Sequenzen wie *Enhancer*-Elementen oder Promotoren (Gasser & Lämmli, 1986; Blasquez *et al.*, 1989). Auch in Introns und zwischen transkribierten Genen konnten S/MAR-Elemente gefunden werden (Garrard, 1990). So zeigen Studien an Lampenbürsten-Chromosomen oder an polytänen Chromosomen bestimmter Amphibien- und Insektenzellen eine Korrelation von aktiven Genen und der Auflockerung bestimmter Chromatinschleifen: Bereiche des Chromatins werden aufgelockert und als Schleife sichtbar, wenn die darauf liegenden Gene aktiviert werden; bei Abschaltung der Gene kondensieren diese Bereiche wieder (Ashburner *et al.*, 1974; Lamb & Daneholt, 1979).

Als Verankerungspunkte der DNA in der Kernmatrix spielen die S/MAR-Elemente eine wichtige Rolle bei der strukturellen Organisation des Chromatins. Die durch ihre Bindungseigenschaften aufgebauten Domänen sind topologisch unabhängige Bereiche. Veränderungen der Superhelizität breiten sich beispielsweise nicht über die Grenzen der Domänen hinaus aus (Zehnbaumer & Vogelstein, 1985). Die Fähigkeit zum Auffangen topologischer Veränderungen wird mit der hohen Tendenz zur Strangtrennung in diesen Elementen erklärt. Sie könnte ein wichtiger Faktor in Transkriptionsprozessen sein, bei denen

während des Fortschreitens der Polymerase vor dem Enzym eine Welle positiver Superhelizität erzeugt wird (Bode *et al.*, 1996 und 2000A).

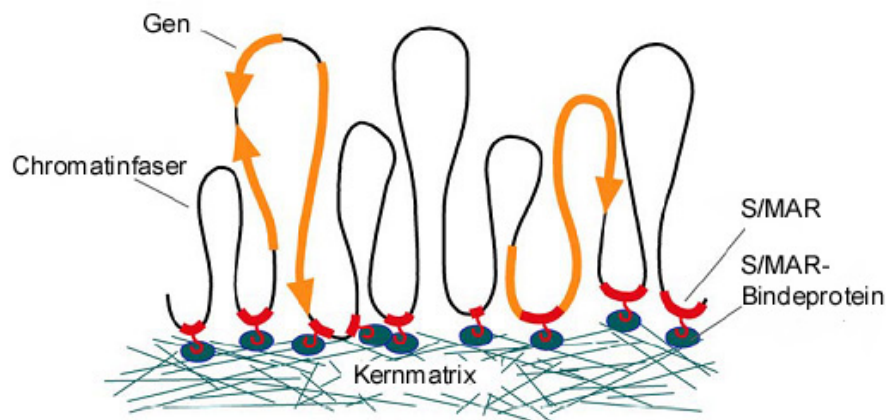


Abb.1.3.: Modellvorstellung für die Organisation des Chromatins Das Chromatin ist nach diesem Modell in Schleifen organisiert, die an ihrer Basis über spezielle DNA-Sequenzen (S/MAR-Regionen) und S/MAR-bindende Proteine mit der Kernmatrix verbunden sind. Jede Schleife stellt eine unabhängige funktionelle Einheit dar.

Neben dem Einfluss auf die Zellkernarchitektur konnten in Transfektionsexperimenten für verschiedene S/MARs transkriptionsfördernde Wirkung gezeigt werden (Stief *et al.*, 1989; Klehr *et al.*, 1991 und 1992; Seibler, 1998). Im Fall des IgH-Gens der Maus sind die beiden *Enhancer* flankierenden S/MARs sogar notwendig für die Aktivierung des Promotors (Jenuwein *et al.*, 1997). Weitere Beispiele, bei denen S/MARs in unmittelbarer Nähe von *Enhancern* liegen, wurden von Gasser & Laemmli (1986) und Jarman & Higgs (1988) beschrieben. Die cis-agierende Eigenschaft der S/MAR-Elemente scheint sich jedoch von denen eines *Enhancers* zu unterscheiden, da, anders als bei diesen, eine Integration in das zelluläre Genom Voraussetzung für die beobachteten Effekte ist (Schübeler *et al.*, 1996). In anderen Veröffentlichungen wird eine determinierende Rolle des S/MAR-Assoziationsmusters für die Zelltypspezifität der Expression bestimmter Gene gezeigt (Bonifer *et al.*, 1994; McKnight *et al.*, 1992). Eine weitere Funktion der S/MAR-Elemente, welche mit ihrer Lokalisierung an den Domänengrenzen verbunden ist, stellt die isolierende Wirkung für Vorgänge an den im Inneren der Domäne liegenden Genen dar. In Untersuchungen zur Expressionsstärke von Transgenen in Abhängigkeit vom Integrationsort konnte gezeigt werden, dass S/MARs eine Isolator-

Funktion ausüben, indem sie die Einflüsse des umgebenden Chromatins auf die Transkription abschirmen (Namciu *et al.*, 1998, Götze *et al.*, 2005).

Arbeiten zur Identifizierung und Analyse von eukaryotischen Replikationsstartpunkten zeigten, dass die Sequenzeigenschaften der bisher isolierten „*Origins of Replication*“ häufig mit denen von S/MAR-Elementen übereinstimmen. Nach einer Hypothese von Bouliskas (1995 und 1996) kann ein Teil der S/MARs als Replikationsstartpunkt während der in der S-Phase ablaufenden Verdopplung des Genoms fungieren. So wurde sowohl in *Drosophila* als auch am DHFR-Locus des Hamsters eine Ko-Lokalisierung von „*Ori*“-Bereichen und S/MARs nachgewiesen (Amati & Gasser 1990; Dijkwel & Hamlin, 1995). Außerdem konnten Carri *et al.* (1986) zeigen, dass die „*Origins of Replication*“ ebenso wie die S/MARs permanent mit der Kernmatrix assoziiert sind.

1.2.2. S/MAR assoziierte Proteine

S/MAR-Elemente sind über spezifische Proteine an die Kernmatrix gebunden. Zu den S/MAR-bindenden Proteinen gehören unter anderem die DNA-Topoisomerase II, die auftretende Torsionsspannungen aus der DNA entfernen kann und Histon H1, das an der Verpackung des Chromatins zur 30 nm-Faser beteiligt ist. Beide besitzen neben einer allgemeinen DNA-Bindeaktivität auch eine Spezifität für S/MAR-Elemente (Adachi *et al.*, 1989; Käs *et al.*, 1989; Izaurralde *et al.*, 1989). Nach einer Modellvorstellung von Laemmli und Mitarbeitern (Zhao *et al.*, 1993) bestimmt Histon H1 zusammen mit den S/MAR-Bindeproteinen HMG-I und -Y den Zustand einer Chromatindomäne. Als weitere S/MAR-bindende und ubiquitär vorkommende Proteine sind Nucleolin und Lamin B1 identifiziert worden (Luderus *et al.*, 1992). Zusätzlich wurden zellspezifisch exprimierte Proteine wie SATB1 und p114 gefunden (Dickinson *et al.*, 1992; Nakagomi *et al.*, 1994).

Von den im Zellkern sehr häufig vorkommenden hnRNP-Proteinen bindet nur eines spezifisch an S/MAR-DNA. Es ist mit einem Molekulargewicht von 120 kDa das größte hnRNP-Protein und wird als SAF-A (Scaffold Attachment Factor A) bezeichnet. SAF-A besitzt eine hochkonservierte DNA-Bindedomäne, die „SAF-box“, welche spezifisch an S/MAR-Sequenzen bindet (Romig *et al.*, 1992; Göhring *et al.*, 1997, Göhring & Fackelmayer 1997) und ist das am häufigsten an S/MAR-DNA gebundene Protein im Zellkern. Neben SAF-A wurde auch SAF-B als ein S/MAR-bindendes Protein identifiziert (Renz & Fackelmayer

er, 1996), das aber nicht mit SAF-A verwandt ist. Beide Proteine sind sowohl in die Zellkernarchitektur, als auch in RNA-Prozessierung involviert.

1.2.3. Der S/MAR-Bindungsassay

S/MARs können über zwei experimentelle Kriterien definiert werden: Entweder über die Assoziation endogener DNA-Fragmente mit der nukleären Matrix (*in situ*) oder über die Assoziation exogener DNA-Fragmente, die an eine Kernmatrix unter Zugabe von Kompetitor-DNA binden können (*in vitro*). Die Isolierung der Kernmatrix erfolgt entweder durch eine Hochsalzbehandlung mit 2M NaCl oder durch eine Detergensbehandlung mit Lithium-Diiodosalicylat (LIS) (Abb. 1.4.). Im Vergleich zur LIS-Extraktion reflektiert die Hochsalzextraktion zusätzlich den transkriptionellen Status einer Zelle (Vassetzky *et al.*, 2000).

Während der Extraktion wird das Chromatin von den nukleosomalen Histonen und anderen löslichen Proteinen befreit und so die DNA für Restriktionsendonukleasen zugänglich gemacht. In der extrahierten Form ist die DNA in Schleifen um die Kernmatrix angeordnet. Diese Schleifen werden über Restriktionsenzyme abgebaut, so dass exogene, zumeist radioaktiv markierte DNA-Fragmente an die Kernmatrix binden können. Dieses Vorgehen wird als *in vitro* Ansatz bezeichnet.

Für eine *in situ* Analyse wird nach dem Abbau der Schleifenstruktur direkt mit einer Sonde gegen eine zu untersuchende DNA-Region hybridisiert. In diesem Fall wird keine DNA von außen zugegeben (Kay & Bode, 1994). Die unterschiedlichen Fraktionen, die Kernmatrix (Pellet) und der nicht-pelletierbare Überstand, werden abschließend getrennt und die Ergebnisse über eine *Southern Blot* Analyse sichtbar gemacht. Die Ergebnisse solcher Bindungsversuche sind in einem Blot in Abbildung 1.4. exemplarisch zu dargestellt: S/MAR-Elemente können in der Pelletfraktion (Kernmatrix) detektiert werden, wohingegen nicht bindende Sequenzen im Überstand zu finden sind.

Ein relativ neuer Ansatz zur Untersuchung von S/MAR-Elementen ist die sogenannte Halo-FISH Methode, die im rechten Teil der Abbildung 1.4. zu sehen ist (siehe auch 1.2.4.) und einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darstellt. Bei dieser Methode werden isolierte Zellkerne vor der Extraktion auf einem Objektträger fixiert. Die Halo-FISH Analyse eignet sich besonders, um eine DNA-Matrix Assoziation in der Zelle real darzustellen (Heng *et al.*, 2004).

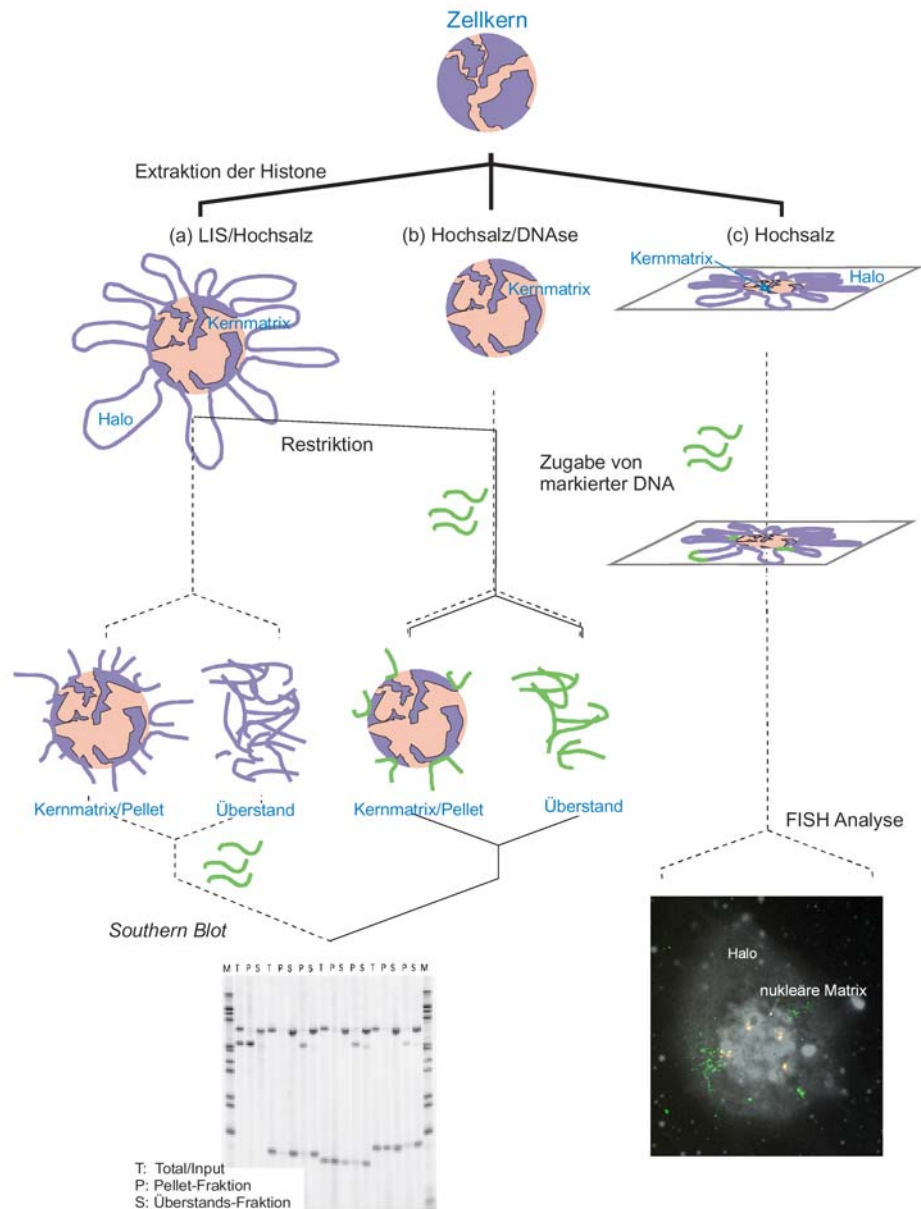


Abb.1.4. Schematische Darstellung des S/MAR-Bindungsassays

a) Verlauf einer *in situ* S/MAR-Analyse, b) *in vitro* Verfahren darstellt, c) Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Bei der *in situ* S/MAR-Analyse werden die DNA-Schlaufen nach der Extraktion abgedaut und die endogene DNA über einen *Southern Blot* visualisiert. Der Blot im unteren Teil der Abbildung repräsentiert das typische Ergebnis eines S/MAR-Bindungsassays. Bei der *in vitro* Methode werden zusätzlich DNA-Fragmente zu den Kernmatrix- Präparaten zugegeben. Die Halo-FISH Analyse ist eine Methode, bei der die Zellkerne auf einem Objektträger extrahiert werden. Die Lokalisation von DNA-Fragmenten wird über eine Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde bestimmt (aus Götze, 2003A).

1.2.4. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) sind früher vor allem zur Genmappierung und zu Translokationsstudien an Metaphasechromosomen eingesetzt worden. Anfänglich wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet,

um bestimmte Zielsequenzen zu identifizieren (Gall & Pardue, 1969). Mit der Entwicklung nichtradioaktiver Markierungsmethoden mittels Fluorochromen, Digoxigenin und Biotin ergab sich die Möglichkeit, mehrere DNA-Sequenzen gleichzeitig zu detektieren. Das Auflösungsvermögen einer FISH-Analyse hängt von den zu hybridisierenden DNA-Präparaten ab. Liegt die zu untersuchende DNA in der Metaphase vor, sind aufgrund des starken Kondensationsgrades nur DNA-Sequenzen in einem Bereich von 1-3 Mb voneinander trennbar. Eine höhere Auflösung, um die 50-200 kb, kann erreicht werden, wenn für eine FISH-Analyse Interphasezellkerne eingesetzt werden. Ein maximales Trennungsvermögen von 1-200 kb wird erreicht bei der Hybridisierung von linearisierter DNA.

Die Halo-FISH Analyse ist eine neue Hybridisierungsmethode zur Charakterisierung von S/MAR-Elementen. Der große Vorteil dieser Methode im Vergleich zu klassischen S/MAR-Bindungsansätzen ist, dass zum ersten Mal Schlaufenstrukturen (Halos) und Matrixbindung in der Zelle visualisiert werden können. Bei der Halo-FISH Analyse werden Zellkerne auf einem Objektträger fixiert. Die löslichen Proteine werden über eine 2M NaCl-Hochsalzlösung extrahiert, was zu einer Entfaltung der DNA und damit zur Schlaufenbildung führt. Durch die vorherige Fixierung der Zellkerne auf einer Glasoberfläche minimiert sich das Risiko, dass es zu einer Remodellierung der DNA-Schlaufen während der Extraktion kommt. Die entstehenden DNA-Schlaufen sind an den Matrixproteinen verankert. Über Hybridisierungsexperimente mit spezifischen Sonden kann jetzt gezeigt werden, ob sich eine DNA-Sequenz in der Schlaufenfraktion (DNA-Halo) oder an der Kernmatrix befindet und somit S/MAR-Charakter aufweist. Die DNA Schlaufenstruktur entspricht im Auflösungsvermögen in etwa dem „nackter“ DNA-Fasern (Wiegant *et al.*, 1992, Heng & Tsui 1998). Somit können auch eng benachbarte Sequenzen auf S/MAR-Charakter hin untersucht werden. Lediglich die Auflösung an der Kernmatrix selbst ist aufgrund von DNA-Protein Wechselwirkungen und DNA-Faltung geringer.

1.3. Computergestützte Vorhersagen von S/MAR-Elementen

Die Verfügbarkeit vollständiger Nukleotidsequenzen verschiedener prokaryotischer und eukaryotischer Organismen regte entscheidend die Entwick-

lung und Anwendung Computer-gestützter Programme an, um die Organisation und Funktion von Genomen adäquat untersuchen zu können.

1.3.1. *Stress-Induced Duplex Destabilization* – Das SIDD-Profil

S/MAR-Elemente sind, wie bereits erwähnt, über einfache Sequenzvergleiche nicht identifizierbar. Mitte der 90er Jahre wurde erstmals ein von C. Benham entwickeltes statistisches Analyseverfahren angewendet, welches der Berechnung der Stabilität der Doppelhelix-Bindung dient (Benham, 1996A, 1996B; Benham *et al.*, 1997). Das *stress-induced duplex destabilization profile* (SIDD-Profil) beschreibt die Stabilität der DNA-Doppelhelix und ermöglicht die Identifizierung jener Loci, die bei der Entstehung negativer, superhelikaler Spannung zur Strangtrennung neigen. Eine derartige Form der Superhelizität tritt bei der Interaktion mit bestimmten Proteinen, beispielsweise DNA- oder RNA-Polymerasen und/oder beim Verschwinden von Nukleosomen, auf. Die Kalkulation des Profils basiert dabei nicht nur auf den Bindungsenthalpien einzelner Basenpaare, sondern bezieht auch den Einfluss benachbarter DNA-Sequenzen mit in die Berechnung ein (Kompetitionsprinzip) (s. Abb. 1.5.a und b). Das Öffnen jeder einzelnen Basenpaarung resultiert in Veränderungen, die sich auf die Verteilung der superhelikalen Deformation (die Verwindung der DNA) auswirken, und somit das Denaturierungspotential aller Basenpaare innerhalb einer Domäne beeinflussen (Benham, 1996A+B). Abbildung 1.5.b zeigt das S/MAR-Profil des Prototyp S/MAR-Elements SAR-E in einem pTZ-Vektorrückgrat. Gut zu erkennen ist das starke Strangtrennungspotential des S/MAR-Elements. Auch der Promotor und Terminator des Ampicillins des Vektors neigen zur Strangtrennung. Wie man jedoch deutlich sieht, verringert sich dieses in Gegenwart eines S/MAR-Elements, da die Destabilisierung innerhalb eines Vektors miteinander konkurriert (Benham *et al.*, 1997).

Traditionell mussten zur Ermittlung von destabilisierten DNA-Bereichen experimentelle Bindungsstudien durchgeführt werden (s.o., Bode & Maass, 1988). Über solche S/MAR-Bindungsstudien können theoretische Vorhersagemodelle, wie das SIDD-Profil, bestätigt und weiterentwickelt werden.

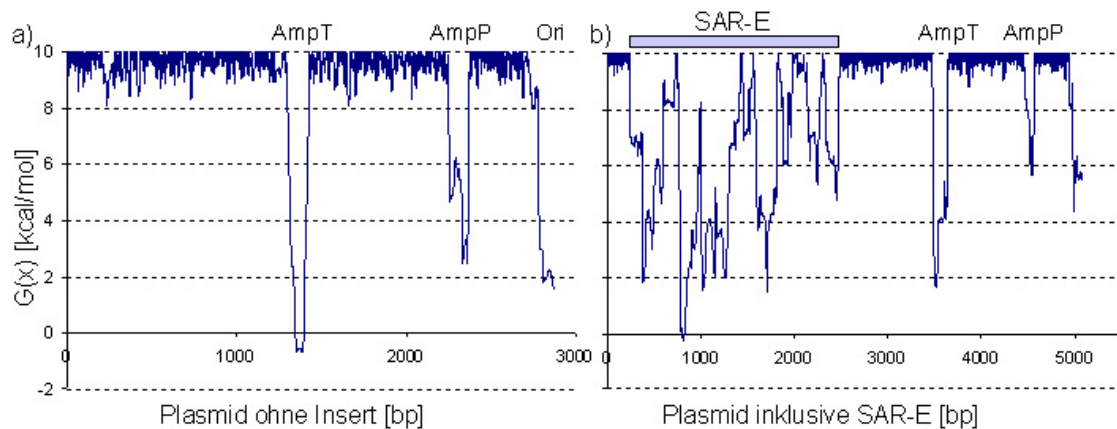


Abb.1.5. Das SIDD-Profil von pTZ a) ohne *Insert* und b) mit integriertem SAR-E In der Grafik ist die freie Enthalpie über der Sequenz aufgetragen. Je niedriger der Wert G ist, desto leichter kann es in diesen Bereichen zur Ausbildung von DNA-Einzelsträngen kommen. Das Vektorrückgrat des Plasmids pTZ ist in den meisten Bereichen stabil. Im leeren Vektor sind Ampicillin-Promotor und –Terminator destabilisiert. Durch das starke Destabilisierungspotential von SAR-E wird diese Neigung zur Einzelstrangbildung jedoch verringert.
(<http://genomics.ucdavis.edu/benham/sidd.change.php>)

1.3.2. Der MAR-Finder oder „MAR-Wiz“

Ein weiteres Programm zur Vorhersage von S/MAR-Elementen ist der MAR-Finder (<http://www.futuresoft.org>) (Singh *et al.*, 1997), der verschiedene charakteristische S/MAR-Motive miteinander kombiniert und ihre Häufigkeit statistisch auswertet. Solche Motive sind u.a. der AT-Gehalt, TG-Reichtum vor allem im 3'UTR von Genen (Boulikas 1993), ATTA-, ATTTA- oder ATTTTA-Motive (Boulikas 1993), Topoisomerase II Restriktionsschnittstellen und gebogene DNA-Konformationen (Mielke *et al.*, 1996). Die aufgelisteten Sequenzmotive können wahlweise in die S/MAR-Analyse mit einbezogen werden. Die Ergebnisse dieser Analysen können grafisch dargestellt werden, ähneln im Aussehen meistens (aber nicht immer) den SIDD-Profilen und stimmen in vielen Fällen mit deren Vorhersagen überein.

1.4. Chromatindomänen und Transgen-Integration

Die stabile Expression eines Transgens ist von besonderem Interesse vor allem für gentherapeutische Anwendungen. Solch eine stabile Expression wird entscheidend vom chromosomalen Kontext beeinflusst. Cis-agierende Elemente wie *Enhancer*, *Locus Control Regions* (LCRs) (Li *et al.*, 1999), genomische Isolatoren (Bell *et al.*, 2001) und S/MARs haben einen Einfluss darauf, ob ein eingebrachtes Transgen stabil transkribiert oder abgeschaltet wird.

Säugerzellen integrieren Fremd-DNA zumeist über einen zufälligen Integrationsmechanismus in bereits vorhandene DNA-Strangbrüche (Scangos & Ruddle, 1981; Bode *et al.*, 2000B). Für solch eine unspezifische Integration wird so gut wie keine Sequenzhomologie benötigt. Dieser unspezifische Integrationsmechanismus wird für herkömmliche Gentransfermethoden wie Calciumphosphat-Transfektion oder Elektroporation angenommen. Im Falle der retroviralen Infektion wird eine nicht-homologe Integration in das Wirtsgenom über die retrovirale Integrase katalysiert (Shih *et al.*, 1988). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der Integrationsort nur vom Zufall abhängt, da das Genom aufgrund von Heterochromatisierung nicht überall gleich gut zugänglich ist. Darüber hinaus sind Retroviren darauf angewiesen, dass nach dem Einbau eine Expression des Provirus erfolgt (Scherdin *et al.*, 1990). Tatsächlich konnte bei der retroviralen Infektion eine Präferenz für S/MARElemente als Integrationsorte beobachtet werden (Mielke *et al.*, 1996, Götze *et al.*, 2005). Retroviral infizierte Zellen scheinen eine Transgenexpression nicht so schnell abzuschalten wie elektroporierte, was ein Hinweis auf den Erhalt der S/MAR-Funktion des Integrationsortes auch nach einer Integration von Fremd-DNA ist (Baer *et al.*, 2000).

1.5. Interferone

Die Interferone wurden als antiviral wirkende Substanzen erstmals durch Isaacs und Lindenmann (1957) beschrieben. Sie konnten einen löslichen Faktor im Überstand von *Influenza A* Virus-infizierten Hühnerzellen der Chorioallantois-Membran nachweisen, der bei Übertragung auf nichtinfizierte Hühnerzellen in der Lage war, eine Virusreplikation zu hemmen. Dieser Proteinfaktor interagiert dabei nicht direkt mit dem Virus, sondern induziert die Biosynthese von Proteinen, die antivirale Resistenzmechanismen vermitteln konnten. Sie bezeichneten diesen Faktor auf Grund seiner Interferenz mit der Virusreplikation als „Interferon“. Wie sich seitdem herausgestellt hat, handelt es sich beim Interferon nicht nur um ein Protein, sondern um eine Multiprotein-Familie, die unter dem Sammelbegriff Interferone (IFN) zusammengefasst wurde. Die verschiedenen Interferone wurden zunächst anhand ihrer zellulären Herkunft in Leukozyten-, Fibroblasten und Immuninterferon eingeteilt. Unterschiede in den serologischen und physikochemischen Eigenschaften zeigten, dass es sich dabei um verschiedene Proteinklassen

handeln musste (Stewart 1980). Das Leukozyteninterferon wird heute als Interferon-alpha (IFN- α), das Fibroblasteninterferon als Interferon-beta (IFN- β) und das durch T-Helferzellen und „natürliche Killerzellen“ (NK) produzierte Immuninterferon als Interferon-gamma (IFN- γ) definiert. Diese drei Gruppen wurden zusätzlich in zwei Hauptklassen unterteilt. Das IFN- α und IFN- β wurden wegen ihrer Säure- und Temperaturstabilität als Typ I Interferone dem säure- und hitzelabilen IFN- γ als Typ II Interferon gegenübergestellt.

Durch die Ausdehnung molekulargenetischer Analysen auf immer mehr Arten konnten Gensequenzen mit Homologien zu humanen Interferonen nachgewiesen und antivirale Effekte der Genprodukte gezeigt werden. Innerhalb der Klasse der *Mammalia* wurden Interferone bei einer Vielzahl verschiedener Tiere wie Schafen, Rindern, Pferden und Schweinen nachgewiesen und biochemisch gut charakterisiert. Auch innerhalb der Klasse der Aves sind Interferone in vielen Arten nachgewiesen worden. Weniger Daten dagegen liegen für niedrigere Vertebraten vor. Innerhalb der Klasse der Pisces wurden im Genom des Zebrafischs *Danio rerio* ein und beim Lachs *Salmo salar* zwei Interferongene identifiziert (Altmann 2003, Robertsen 2003).

1.5.1. Die Typ I Interferone

Die Familie der Typ I Interferone besteht im Gegensatz zum singulären IFN- γ -Gen aus knapp 20 Mitgliedern, die strukturell untereinander, jedoch nicht mit dem IFN- γ verwandt sind. Im humanen System werden inzwischen 4 verschiedene Proteingruppen zu den Typ I Interferonen gezählt. Dies sind im einzelnen IFN- α , - β , -omega (- ω), und -kappa (- κ). In der Klasse der *Mammalia* werden zum Teil noch weitere Typ I Interferone nachgewiesen wie z.B. IFN-tau (τ) oder das IFN-delta (δ). Trotz dieser Vielfalt sind die Interferone IFN- α und IFN- β die wesentlichen Mediatoren bei der Etablierung einer antiviralen Aktivität des Immunsystems. Bei allen untersuchten Säugetierarten wurde für das IFN- β nur je ein Genlocus nachgewiesen. Demgegenüber setzt sich das IFN- α aus einer Multigen-Familie zusammen, deren Mitglieder in Subgenclustern angeordnet sind.

1.5.2. Vergleich von Typ I Interferonen

Der 400 kb große Interferon-Gencluster ist im humanen System auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 lokalisiert (Owerbach 1981, Diaz 1994). Die Lage der IFN- α und IFN- β Gene innerhalb eines Genclusters, ihre gemein-

same intronfreie Genstruktur und der hohe Homologiegrad sind deutliche Hinweise auf eine evolutionäre Entwicklung durch Duplikationsereignisse eines Vorläufergens (Roberts *et al.*, 1998).

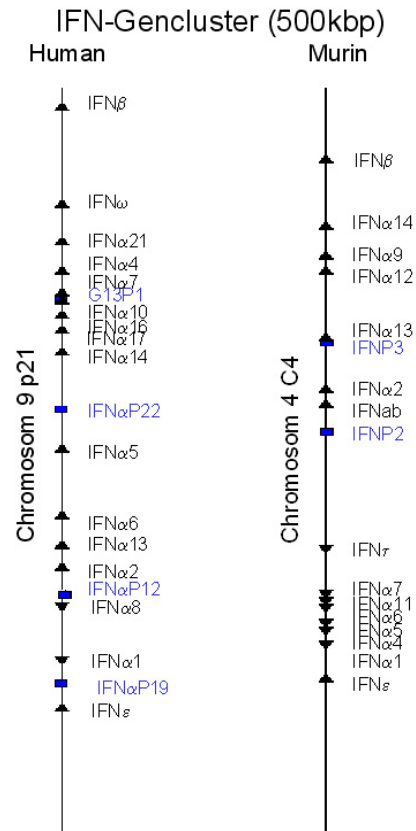


Abb.1.6. Interferon-Gencluster von *Homo sapiens* und *Mus musculus*. Dargestellt sind jeweils 500kb des humanen und murinen Interferon Genclusters. Es sind alle Gene (schwarze Pfeilspitzen) und Pseudogene (blaue Rechtecke) aus der NCBI-Datenbank aufgetragen.

Beim Menschen konnten 26 IFN- α Gene, und bei der Maus 17 verschiedene IFN-Isoformgene identifiziert werden (van Pesch *et al.*, 2004). Die 26 humanen IFN- α Gene weisen im kodierenden Bereich untereinander eine 85%ige Sequenzidentität auf DNA-Ebene auf, die eine im Mittel 80%ige Aminosäuresequenz-Homologie der Isoformen untereinander bedingt. Allerdings werden nur 15 der 26 huIFN- α Isoformen exprimiert, da es sich bei den übrigen Genen um inaktive Pseudogene handelt.

1.5.3. S/MAR-Elemente im humanen Typ I Interferon-Gencluster

Das „SAR-E“ Element 5' vom humanen IFNB1-Gen war eines der ersten S/MAR-Elemente, dessen Funktionen näher charakterisiert wurden. Mit dem SAR-E sind unter anderem ein starkes Kernmatrix-Bindungsverhalten (Mielke

et al., 1990), DNase I Hypersensitivität (Bode *et al.*, 2000a) und eine erhöhte Transgenexpression in Standard-Transfektionsexperimenten assoziiert (Mielke *et al.*, 1990, Klehr *et al.*, 1991). Biochemische Analysen zeigen, dass das SAR-E ein hohes Potential zur Einzelstrangbildung besitzt (Mielke *et al.*, 1990, Bode *et al.*, 1992), welches auch im SIDD-Profil reflektiert wird (Götze, 2003). Die IFNB1-Domäne wird beim Menschen durch zwei starke S/MARs flankiert, 5'-proximal durch SAR-E und 3'-terminal durch SAR-I, welches ein ähnlich hohes Bindungspotential besitzt wie SAR-E. Anhand von Bindungsstudien am humanen Interferon-Gencluster kann gesagt werden, dass es einen generellen „strukturellen Code“ für Gene gibt: universell ist für funktionelle Gene der Promotor-, besonders aber der Terminator-Bereich destabilisiert und die kodierende Region stabil; bei Pseudogenen, die keinem Selektionsdruck mehr unterliegen, kann dieser Code im Laufe der Zeit verloren gehen (Hardy *et al.* 2004, Winkelmann *et al.* 2006). Im Zuge dieser Arbeit soll herausgearbeitet werden, ob dieser strukturelle Code auch in anderen Organismen, wie zum Beispiel der Maus, Gültigkeit besitzt.

1.6. Aufgabenstellung

Im Fokus dieser Arbeit liegt die Analyse und der Vergleich intergenischer Bereiche, welche durch die zunehmenden Daten aus den Genomprojekten zugänglich werden. Die Zellkernarchitektur wird in weiten Teilen durch die dynamische Assoziation von S/MAR-Elementen mit dem Kernskelett bestimmt. S/MARs begrenzen genomische Regionen unterschiedlicher Funktion auf zellspezifische Weise. Ein Ziel dieser Promotionsarbeit ist, S/MAR-Elemente *in vitro* und *in situ* umfassend zu analysieren und zu charakterisieren. Vor allem im Bereich des Interferon-Genclusters sollen S/MAR-Elemente bei Mensch, Maus und Schimpanse identifiziert und ihre Kernmatrix-Bindungsaffinitäten miteinander verglichen werden. Da diese Elemente keine Sequenzhomologie, wohl aber gemeinsame strukturelle Prinzipien aufweisen, erfolgt die Analyse im Rahmen dieser Arbeit aus einer Kombination system- und molekularbiologischer Verfahren. Durch den SIDD-Algorithmus ist es möglich, Position und Aktivität von S/MARs vorherzusagen.

Ein neues Verfahren, um DNA-Kernmatrix Interaktionen *in situ* beobachten zu können, ist die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Aktuelle Studien belegen, dass S/MARs in der Organisation eukaryotischen Chromatins

eine wichtige Rolle spielen, und das Chromatin in Domänen (*loops*) separieren (Heng *et al.*, 2004). Auf molekularer Ebene interagieren S/MARs mit konstitutiven Proteinen, wie zum Beispiel SAF-A oder Lamin. Diese Verbindungen können regulatorischen Einfluss bei zelltypspezifischen Faktoren haben (Bode *et al.*, 2000B; Dobрева *et al.*, 2003;). Ausserdem gelten S/MARs als bevorzugte Integrationsorte für Retroviren (Narezkina *et al.*, 2004; Johnson & Levy, 2005). Mittels Halo-FISH soll die Position solcher Integrationsereignisse visualisiert werden.

2. Ergebnisse

Nach dem Domänenmodell ist das Chromatin einer eukaryotischen Zelle in einer Art Schlaufenstruktur organisiert, wobei die S/MAR-Elemente die Anheftungspunkte der DNA an die Kernmatrix darstellen und die Gene innerhalb der DNA-Schleife lokalisiert sind (Gasser & Laemmli, 1987; Vogelstein *et al.*, 1980). Beim dynamischen Modell gibt es 2 unterschiedliche Arten von S/MARs: konstitutive und fakultative S/MARs. Hier erfolgt die Anheftung erst in Vorbereitung der Transkription (vgl. Abb. 2.1.).

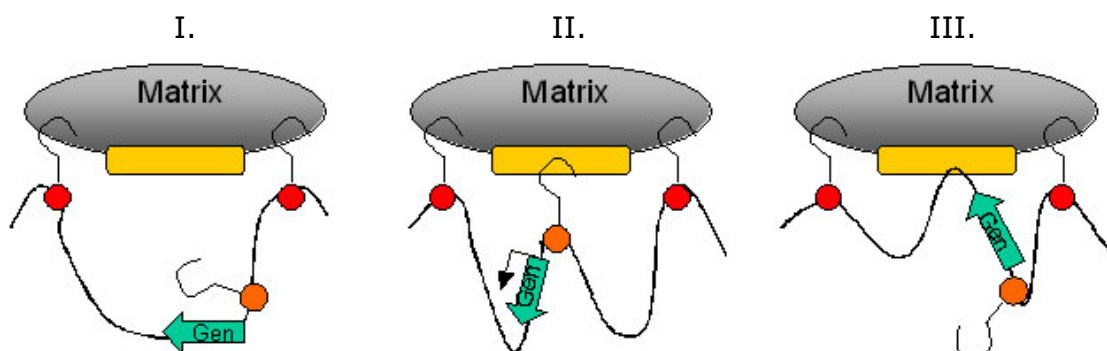


Abb. 2.1. Konstitutive und fakultative S/MARs nach dem Modell von Bode *et al.* (2004). (I.) Konstitutive S/MARs (rot) grenzen eine Chromatindomäne ein und sind permanent an der nukleären Matrix verankert. (II.) Nach der Induktion eines Gens innerhalb der Domäne reagiert das entsprechende fakultative S/MAR Element (orange) auf topologische Veränderungen wie z. B. Histon-Acetylierung, und das Gen wird durch den Transkriptionsapparat (gelbe Box) geschleust. (III.) Die Transkription wird durch Trennung vom Transkriptionsapparat beendet, und die Ausgangssituation (I.) wird wieder hergestellt.

Die DNA-Sequenzen, welche die schlaufenförmigen Chromatindomänen (Abb. 1.3.) begrenzen, haben nicht nur eine strukturelle Bedeutung, sondern sind auch in die Regulation der Genaktivität involviert. Es gibt zwei unterschiedliche Klassen von DNA-Elementen, welche an den Grenzen von Gendo-

mänen lokalisiert sind (Übersicht in Mishra & Karch, 1999), S/MAR-Elemente und Insulatoren (Isolatoren; abgeleitet vom engl. *insulators*), welche zusammenfassend als *boundary elements* bezeichnet werden. S/MAR-Elemente bilden durch Verankerung an die Kernmatrix die Basis der Chromatinschleifen. Diese Bindung ist die Grundlage biochemischer Verfahren zur Identifizierung von S/MAR-Elementen.

Die zweite Klasse von DNA-Elementen, welche sich an den Grenzen von Gendomänen befinden, sind die Insulatoren. Es gibt zwei Kriterien, einen Insulator zu definieren. Ursprünglich wurden sie durch ihre Fähigkeit detektiert, Gene gegenüber Positionseffekten des umliegenden Chromatins abzuschirmen. Die zweite Wirkung ist die sogenannte *Enhancer Blocking* Aktivität. Bei Lokalisierung zwischen einem *Enhancer* und einem Promotor blockieren Insulatoren die Aktivierung des Promotors durch den Enhancer. Die meisten Insulatoren wurden bislang in *Drosophila* identifiziert, doch kommen sie auch in Vertebraten und Hefe vor (Übersicht in Bell & Felsenfeld, 1999 sowie Mishra & Karch, 1999). Domänengrenzen und Insulatoren schirmen Gene innerhalb einer Chromatindomäne von Stimulations- und Repressionseffekten benachbarter Regionen ab. Auch S/MAR-Elementen werden solche Insulator-Fähigkeiten zugesprochen (Götze *et al.*, 2005, Antes *et al.*, 2001).

Der am besten charakterisierte Vertebraten-Insulator ist die DNaseI hypersensitive Site 4 aus dem 5' Bereich des β -Globingenclusters des Huhns (5'HS4 oder cHS4). Dieses 1,2 kbp großes Fragment, welches die hypersensitive Site enthält, besitzt *Enhancer Blocking* Aktivität und schirmt von Positionseffekten in *Drosophila* ab (Chung *et al.*, 1993). Auch schützt dieser Insulator in Vertebraten-Zelllinien vor Positionseffekten und wirkt einem Expressionsverlust durch Verhinderung von Histondeacetylierung entgegen (Pikaart *et al.*, 1998).

Einige, aber nicht alle Insulatoren haben S/MAR Charakter und ebenso wie S/MAR-Elemente besitzen auch Insulatoren keine Konsensus-Sequenz. Jedoch kommen, ebenfalls in Analogie zu S/MARs, in allen Insulatoren DNase I hypersensitive Sites vor, welche ein Indiz für Proteinbindung sind (Bode *et al.*, 2000A). Tatsächlich wurde eine Reihe Insulator-bindender Proteine identifiziert, welche sich zwischen Vertebraten, *Drosophila* und Hefe unterscheiden und keine Homologien zueinander besitzen. An das 250 bp große 'Core' Frag-

ment des cHS4-Insulators bindet das ubiquitär exprimierte Protein CTCF ('CCCTC-binding factor'; Bell *et al.*, 1998).

CTCF besitzt vielfältige Rollen in Transkriptions-Aktivierung und -Inaktivierung und bindet auch an andere Insulator-Sequenzen aus Vertebraten. Die CTCF-Bindungsstelle ist im cHS4- Insulator essentiell für die '*Enhancer Blocking*' Aktivität, nicht jedoch für die Fähigkeit Positionseffekte abzuschirmen (Bell *et al.*, 1998). Im endogenen Kontext ist der Insulator zwischen den β -Globingenen und dem unabhängig regulierten 5' gelegenen Folatrezeptorgen gelegen. Es ist wahrscheinlich, dass die '*Enhancer Blocking*' Aktivität eine unangemessene Aktivierung dieser Gene durch regulatorische Elemente der jeweils anderen Domäne verhindert, während die Fähigkeit, von Positionseffekten abzuschirmen, der Ausbreitung einer zwischen diesen Domänen gelegenen kondensierten Chromatinstruktur entgegenwirkt (Prioleau *et al.*, 1999). Stromabwärts der β -Globingene befindet sich im Huhn ebenfalls ein Insulator (3'HS), welcher diese von einem in anderen Geweben exprimierten Gen für einen Geruchsrezeptor trennt (Saitoh *et al.*, 2000).

2.1. Grenzstrukturen und ihre Matrix-Assoziation

Sequenzspezifische Rekombinationssysteme sind inzwischen wichtige Methoden für zielgerichtete Integration von Transgenen an bestimmte chromosomale Orte geworden. Um die Effekte von unterschiedlichen vermeintlichen domänenbegrenzenden Elementen zu untersuchen, wurde die RMCE-Methode (*Recombinase-Mediated Cassette Exchange* (Bode *et al.*, 2000)) angewandt (s. Götze *et al.*, 2005).

Aus der murinen Zelllinie NIH3T3 wurden in unserer Arbeitsgruppe nach Transfektion mit einem Target-Vektor fünf Einzelklone etabliert, die folgendes Parental-Konstrukt beinhalten: das Hyg-tk-Fusions-Gen unter der Kontrolle eines *tk*-Promotors. Die fünf Klone (N1, N7, N15, N33 und N40) unterscheiden sich in der Expressionsstärke des β -geo-Fusionsgens, da sie unterschiedliche Integrationsorte des Fusionsgens haben und somit unterschiedlichen chromosomalen Bedingungen unterliegen. Um einen direkten Vergleich zwischen einem bekannten S/MAR und dem cHS4-Element zu ermöglichen, wurde nun eine Luziferase-eGFP-Expressionskassette, flankiert von unterschiedlichen Elementen, gegen die bekannten Parentalkonstrukte ausgetauscht (s. Abb. 2.2.).

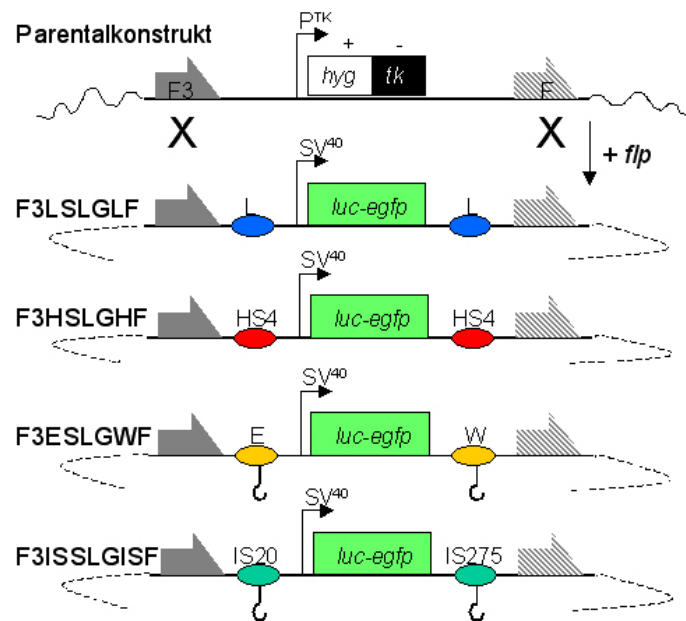


Abb. 2.2. Schematische Übersicht über das RMCE-Konzept. Oben ist das Parentalkonstrukt nach Linearisierung und Integration ins Genom schematisch dargestellt. Das Hyg-tk-Fusions-Gen steht unter der Kontrolle eines *tk*-Promotors und wird von zwei FRT-Sites, den Erkennungsstellen für die Flp-Rekombinase, eingefasst, welche als Halbpfeile dargestellt sind. In Anwesenheit einer aktiven Flp-Rekombinase erfolgt ein Austausch der Reportergene zwischen den FRT-Sites. Die Austauschkonstrukte beinhalten eine Luziferase-eGFP-Expressionskassette unter der Kontrolle des SV40-Promotors, welche von folgenden Konstrukten flankiert wird (vgl. auch Abb.2.5.): F3LSLGLF = Zwei vermutlich inaktive *Spacer*-Sequenzen aus dem Lambda-Phagen; F3HSLGHF = Zwei Dimere des cHS4-Insulators; F3ESLGWF = Charakterisierte S/MAR-Sequenzen, die das humane IFN β -Gen flankieren; F3ISSLGISF = Zwei Inter-genische Sequenzen aus dem humanen IFN-Gencluster mit hohem S/MAR-Potential (nach Götze *et al.*, 2005).

Die Austauschkonstrukte, unter der Kontrolle des SV40-Promotors, werden von folgenden Konstrukten flankiert: F3LSLGLF = Zwei vermutlich inaktive *Spacer*-Sequenzen aus dem Lambda-Phagen; F3HSLGHF = Zwei Dimere des cHS4-Insulators; F3ESLGWF = Charakterisierte S/MAR-Sequenzen, die das humane IFN β -Gen flankieren; F3ISSLGISF = Zwei Inter-genische Sequenzen aus dem humanen IFN-Gencluster mit hohem S/MAR-Potential (vgl. Abb.2.5.). Anschließend konnte die eGFP-Floureszenz gemessen und verglichen werden. Der Klon N1 zeigte die höchste Expression nach dem Austausch, bei den Klonen N7 und N33 betrug die Expression etwa 50% und die beiden Klone N15 und N40 wiesen die niedrigste Expression auf. Diese RMCE-Versuche haben gezeigt, dass ähnliche, aber doch unterschiedliche, nichtkodierende DNA-Grenzen unterschiedliche Effekte auf ein bestimmtes chromosomales Umfeld haben. Die strukturelle Funktion der unterschiedlichen Elemente auf molekularem Level sollte charakterisiert werden. Es wurde durch

Expressionsstudien gezeigt, dass der cHS4-Insulator und auch die S/MAR-EW-Sequenzen eine Transkriptionssteigerung vermitteln, indem repressive Effekte unabhängig vom Integrationsort abgeschirmt werden. Für die 2 intergenischen Sequenzen (IS) aus dem humanen IFN-Gencluster mit hohem S/MAR-Potential stellt sich eine andere Situation dar. Die IS-Elemente scheinen keine Barrieren gegen Integrationsort-abhängige Positionseffekte darzustellen. Die Sequenzen stammen aus einer intergenischen Region in Erweiterung an das humane IFN-Gencluster (Götze *et al.*, 2003). Das 567bp lange Fragment IS20 und das 515bp lange IS275 beinhalten beide eine etwa 300 bp lange destabilisierte *Core*-Sequenz, sie zeigen in Wettbewerbsversuchen starke Matrixassoziation und nach stabiler Integration einen *Augmentation*-Effekt. Dieses Potential (Bode *et al.*, 2000b: "*augmentation potential*"), einen positiven Effekt auf den Transkriptionslevel auszuüben basiert auf der Abschirmung der meisten negativen Einflüsse des genetischen Umfelds und ist von der Chromatinstruktur abhängig (Festenstein *et al.*, 1996). Eine Transkriptionssteigerung konnte nur nach stabiler, nicht aber nach transienter Integration beobachtet werden. Im Fall der *Spacer*-Sequenzen aus dem Lambda-Phagen konnte kaum eine Veränderung der Expressionseigenschaften bei den unterschiedlichen Integrationsorte detektiert werden. Die Vermutung, dass es sich bei den bakteriellen Sequenzen um inaktive *Spacer* handelt, wurde bestätigt. Um die unterschiedlichen Klongruppen darüber hinaus bezüglich ihrer *in situ* Kernmatrix-Assoziation zu untersuchen, wurde die Methode der Halo-FISH Hybridisierung eingesetzt.

2.1.1. FISH Analysen zur Matrixassoziation von Grenzstrukturen

Nach dem Kassettenaustausch wurde die Lokalisation der SLG-Expressionskassette mehrerer Subklone von N40 via FISH untersucht. Die über eine Hochsalzlösung extrahierten Zellkerne (4.12.2.) wurden mit einer Digoxigenin-markierten *Hyg-tk*-Sonde hybridisiert (4.13.). Da es sich bei der zu detektierenden Fremd-DNA um integrierte Einzelkopien handelte, wurde die Signalintensität über eine alkalische Phosphatase vermittelte Farbreaktion verstärkt (rote Signale, siehe 4.13.3.).

Für jeden dieser Subklone wurden 50 bis 100 hybridisierte Zellkerne aus mindestens zwei unterschiedlichen Hybridisierungsansätzen ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungsversuche sind in Tabelle 2.1. und in Abb. 2.3. zusammengefasst. Um eine statistisch abgesicherte Aussage machen zu kön-

nen, wurden von jedem untersuchtem Klon 50 bis 100 hybridisierte DNA-Halos aus unterschiedlichen Präparationen mikroskopisch ausgewertet. Der Integrationsort des *hyk-tk*-Konstrukts ließ sich bei 80 – 90% der Hybridisierungen beim Parentalklon N40 an der nukleären Matrix nachweisen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Integration der Expressionskassette in der Nähe eines endogenen S/MAR-Elements erfolgte.

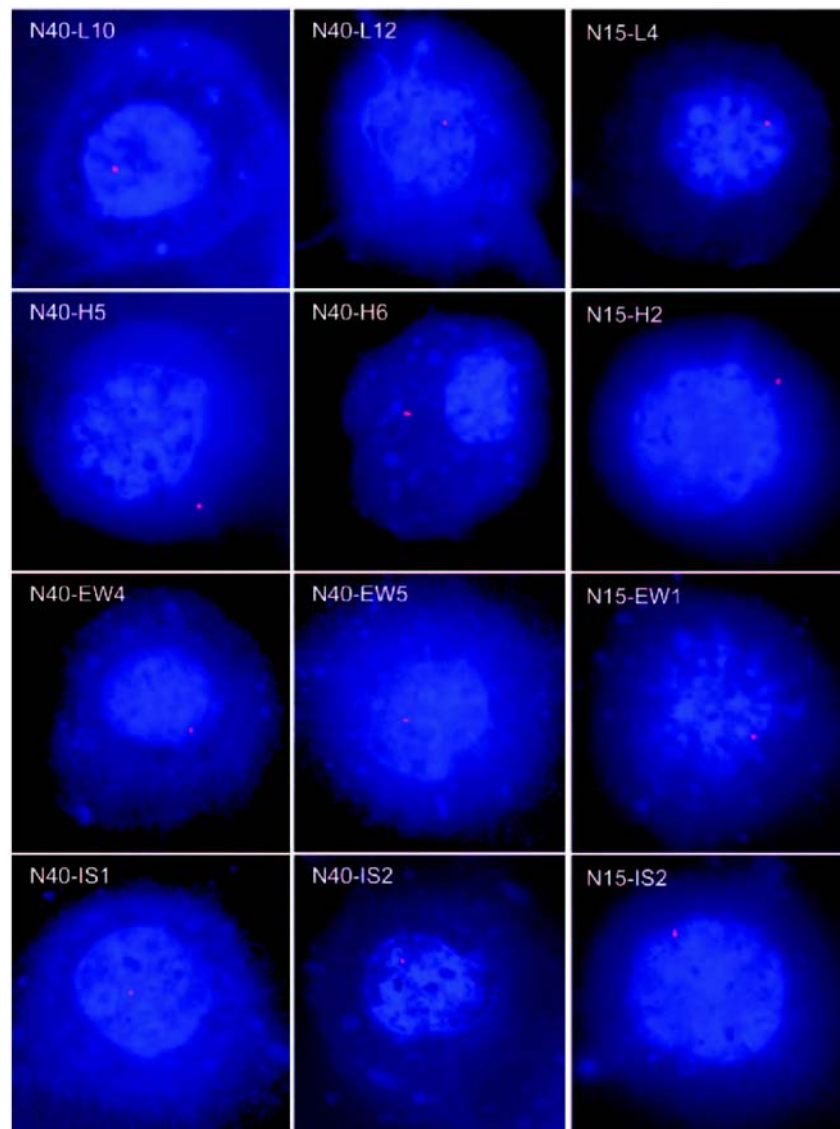


Abb. 2.2. Verteilung der Signale der SLG-Expressioskassette in den Austauschklonen nach der Halo-Präparation und anschließender Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Isolierte Zellkerne der Subklone N40 und N15 wurden auf Objektträger zentrifugiert und einer Hochsalzextraktion unterzogen, um die Verteilung der Expressionskassette an der nukleären Matrix auszuwerten. Die Behandlung mit 2 M NaCl bewirkt eine Extraktion der Histone und der löslichen, nicht zur Kernmatrix gehörenden Proteine, und hinterlässt die DNA in Schleifen (*loops*), die an die verbleibende Kernmatrix verankert sind. Für die Untersuchung aller Austauschklone wurden FISH-Hybridisierungen mit dem rot markierten Transgen durchgeführt. Die Integration der S/MAR-EW, IS-S/MAR und Lambda Expressionskassetten konnte überwiegend an der Matrix detektiert werden, während für das integrierte *chs4* Konstrukt eine partielle Ablösung von der Matrix nachgewiesen werden konnte.

Die Matrix-Assoziation der Subklone, flankiert von den starken S/MAR-Elementen E und W, entsprach unseren Erwartungen und lag bei etwa 85%. Auch bei den intergenischen S/MARs und in Gegenwart der Lambda-Sequenzen wurde die Matrix-Assoziation nicht beeinflusst. Eine auffällige Abweichung war nur bei den Subklonen mit cHS4-Insulator flankierter Expressionskassette zu beobachten. Hier war nur bei etwa der Hälfte der untersuchten Zellkerne eine Assoziation mit der nukleären Matrix zu beobachten (vgl. Tab. 2.1. und Abb. 2.3.).

Subklon	Integrationsereignisse	
	Gesamt	Integration an Matrix (%)
N40 (Parentalkonstrukt)	74	81
N40-L10	52	85
N40-L12	64	81
N40-H5	71	51
N40-H6	53	55
N40-EW4	62	78
N40-EW5	66	86
N40-IS1	82	71
N40-IS2	183	77
N15 (Parentalkonstrukt)	79	83
N15-L4	54	84
N15-H2	96	70
N15-EW1	91	93
N15-IS2	50	94

Tab. 2.1. Verteilung der FISH-Signale der *gelabelten* Expressionskassette (SLG) an der nukleären Matrix oder an der Halo (durch Extraktion der löslichen Proteine ausgeloopte DNA). **L**= Kassette mit zwei vermutlich inaktiven Spacer-Sequenzen aus dem Lambda-Phagen; **H**= Kassette mit Dimeren des cHS4-Insulators; **EW**= Kassette mit charakterisierten S/MAR-Sequenzen SAR-E und SAR-W; **IS**= Kassette mit zwei Intergenischen Sequenzen aus dem humanen IFN-Gencluster mit hohem S/MAR-Potential. Die fettgedruckten Werte entsprechen den Subklonen mit integriertem cHS4-Element. (vgl. Abb. 2.2.).

Zusätzlich wurde der Subklon N15 mittels FISH-Analyse untersucht. In Voruntersuchungen wies dieser Subklon vergleichbare Eigenschaften hinsichtlich des Expressionsverhaltens zu Integrationsort N40 auf, und auch die FISH-Ergebnisse waren ähnlich. Die Matrix-Assoziationsraten der unterschiedlichen Subklone waren vergleichbar: Die Lambda- und S/MAR-flankierten Expressionskassetten wurden zu 84%-94% an der nukleären Matrix nachgewiesen, während das cHS4-Konstrukt eine signifikant verringerte Affinität aufwies. Offenbar interferiert der im Austauschkonstrukt eingebrachte Insulator cHS4 mit der Chromatinstruktur des Integrationsortes.

CTCF wurde als Protein der nukleären Matrix beschrieben (Dunn *et al.*, 2003). Bei einer Immunofärbung der Halo-Präparationen wurde deutlich, dass bei den hochsalzextrahierten Zellkernen nur geringe CTCF-Anteile in der Matrix-Fraktion zurückbleiben, während das Matrixprotein Lamin B auch nach der Extraktion noch zu gleichen Teilen vorhanden ist wie vor der Behandlung mit 2 M NaCl (Abb. 2.4.).

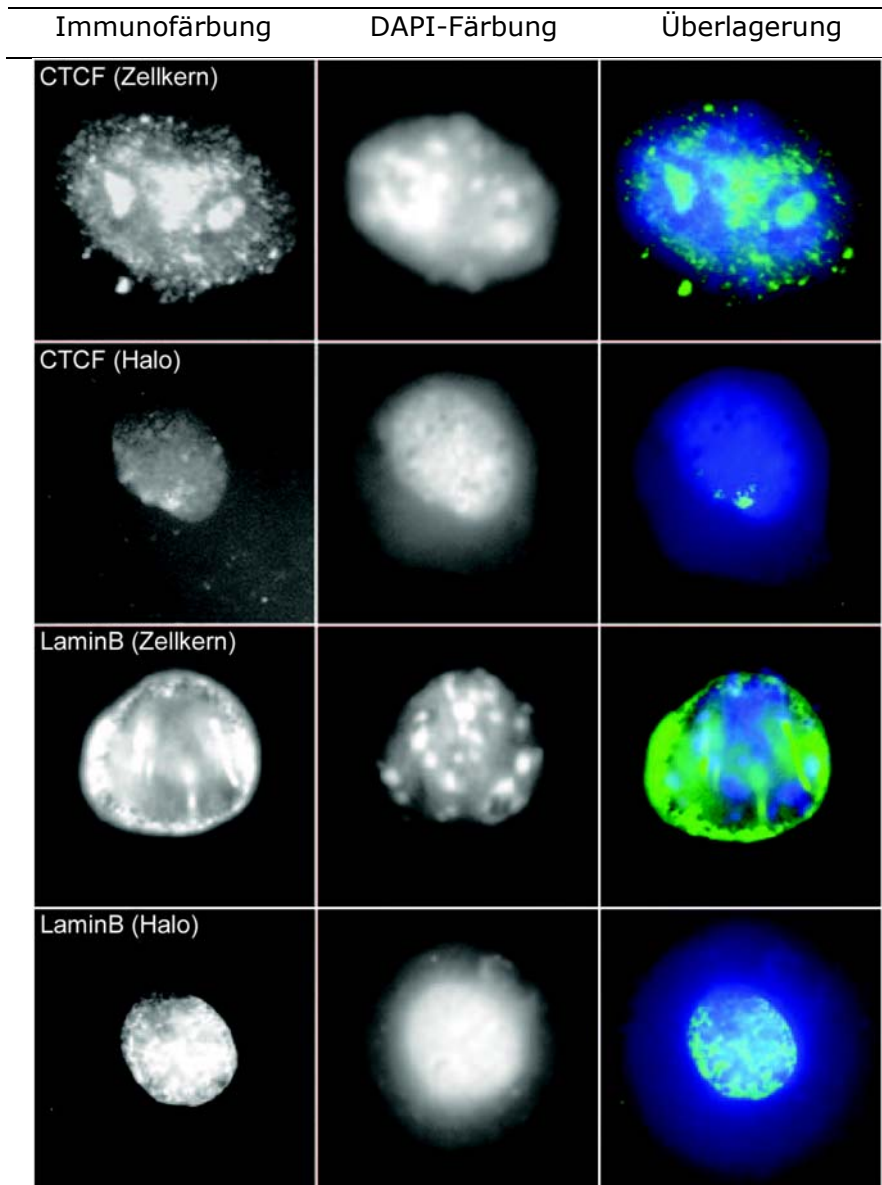


Abb. 2.4. Lamin B und CTCF Immunofärbung in unbehandelten und hochsalz-extrahierten Zellkernen. Das Matrixprotein Lamin B kann auch bei der Halo-Präparation mit einem Antikörper nachgewiesen werden (grün), während das Protein CTCF größtenteils durch die Extraktion der Zellkerne ausgewaschen wurde.

2.1.2. Biomathematische Analysen zur Matrixassoziation von Grenzstrukturen

Die Bindung der S/MAR-Elemente an die Proteine der Kernmatrix ist das Hauptkriterium für ihre biochemische Identifizierung. Dabei scheint die Erkennung spezifischer Strukturmerkmale von entscheidender Bedeutung zu sein. Die Tendenz zur Strangtrennung in diesen Bereichen hat sich als ein wichtiger Parameter herausgestellt. Einzelsträngigkeit in S/MARs wurde von Bode *et al.* (1992) *in vitro* und zuvor *in vivo* (Bode *et al.*, 1986) nachgewiesen und ihre Bedeutung für die Matrixbindung anhand von Mutationsexperimenten demonstriert.

1997 wurde das von Benham *et al.* entwickelte statistische SIDD-Verfahren vorgestellt, das der Berechnung der Stabilität der Doppelhelix-Bindung dient (vgl. Kap. 1.3.). Ein weiterer Ansatz zur Vorhersage von S/MAR-Sequenzen stützt sich auf die Auswertung spezifischer Sequenzmotive. Das mathematische Modell des MAR-Finders wurde 1997 von Singh *et al.* veröffentlicht (vgl. Kap. 1.3.2.). Es basiert auf der Identifizierung von S/MAR-spezifischen Sequenzmotiven (AT-Muster, AT-Reichtum, ORI-Motive, gebogenen DNA-Konformation, TopoisomeraseII-Schnittstellen, ATC-Motiv) und auf der statistischen Auswertung der Häufigkeit ihres gemeinsamen Auftretens innerhalb eines DNA-Bereiches. Eine signifikante Häufung von S/MAR-Motiven lässt auf die Existenz eines S/MAR-Elementes schließen.

In vielen Fällen stimmen die beiden biomathematischen Verfahren bezüglich ihrer Vorhersage von S/MARs überein (Götze *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass alle S/MARs *base unpairing regions* (BURs) darstellen, welche unter dem Einfluss der in einem Plasmid gegebenen negativen Superhelizität ($\sigma = -0,055$) zu Strangtrennung neigen. Lokale DNA-Denaturierung ist ein bestimmender Schritt bei der Initiation von Replikation und Transkription. Bei der letzteren erleichtert eine lokal vorhandene negative superhelikale Spannung im Promotorbereich das Binden der RNA-Polymerase an den entsprechenden DNA-Matrizenstrang. Durch das Voranschreiten der RNA-Polymerase während der Elongation wird eine Welle positiver Superhelizität vor der Transkriptionsmaschinerie und negative superhelikale Spannung dahinter erzeugt (Liu & Wang, 1987; Tsao *et al.*, 1989). Zu vergleichenden Zwecken wurden die unter 2.2. eingeführten Grenzregionen (zwei vermutlich inaktive Spacer-Sequenzen aus dem Lambda-Phagen, zwei Dimere des cHS4-

Insulators, die charakterisierten S/MAR-Sequenzen E20 und W, die das humane IFN β -Gen flankieren und zwei Innergenische Sequenzen aus dem humanen IFN-Gencluster mit hohem S/MAR-Potential) im F3SGTNF-Vektorrückgrat analysiert (Abb.2.5).

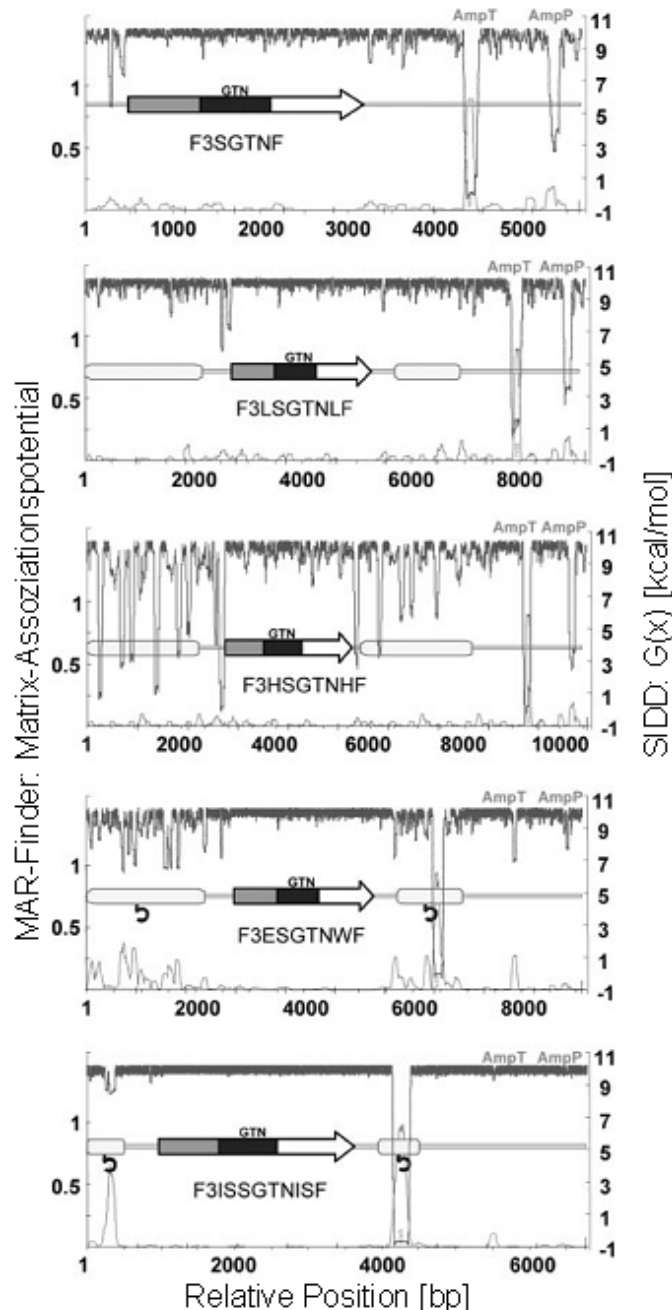


Abb. 2.5. SIDD- und MAR-Finder Profile für unterschiedliche Grenzstrukturen. Das SIDD Profil (obere Kurve in den einzelnen Darstellungen) zeigt die Möglichkeit der Trennung zweier Basen als Funktion zur Basenpaarposition in einem bestimmten Sequenzabschnitt. Die steigende freie Energie $G(x)$ reflektiert die Stabilität einer DNA-Sequenz bei einer definierten superhelikalen Spannung ($\sigma = -0,055$). Dabei wird die Tendenz zur Bildung von Einzelstrang-DNA angezeigt, welche mit dem Bindungspotential von DNA mit der nukleären Matrix übereinstimmt (Benham *et al.*, 1997).

Das MAR-Finder Profil (untere Kurve in den einzelnen Darstellungen) wurde unter Verwendung der gebotenen default Einstellungen erstellt.

Im Vergleich der unterschiedlichen Konstrukte (zwei vermutlich inaktive Spacer-Sequenzen aus dem Lambda-Phagen, zwei Dimerre des cHS4-Insulators, die charakterisierten S/MAR-Sequenzen E und W, die das humane IFN β -Gen flankieren und zwei Innergenische Sequenzen aus dem humanen IFN-Gencluster mit hohem S/MAR-Potential) im F3SGTNF-Vektorrückgrat wird deutlich, dass unterschiedliche Klassen von Grenzstrukturen existieren.

Der Vektor beinhaltet zusätzlich zu der in Abb. 2.2 beschriebenen eGFP-Expressionskassette das Resistenzgen für Ampicillin und somit dessen Terminator (AmpT) und Promotor (AmpP) als interne Destabilisierungsstandards (Kowalski *et al.*, 1988). Keines dieser prokaryotischen Elemente hat für sich genommen S/MAR-Aktivität, doch die Destabilisierung konkurriert mit der

Destabilisierung der anderen Elemente innerhalb des Vektors (Benham *et al.*, 1997). In Abbildung 2.5 wird dies in den Analysen der Vektoren F3SGTNF und F3LSGTNLF deutlich. Hier sind die Destabilisierungsmuster für Amp^r und Amp^P sehr stark, da der Vektor keine konkurrierenden destabilisierten Regionen beinhaltet. Bei Vektor F3ISSGTNIS dagegen verschwindet die Destabilisierung des Ampicillinterminators und –Promotors nahezu aufgrund der starken Destabilisierung der innergenischen Sequenzen aus dem humanen IFN-Gencluster mit hohem S/MAR-Potential (vornehmlich IS275, *downstream*).

In Konstrukt F3ESGTNWF sind zwei unterschiedliche S/MAR-Element Typen vertreten. Während ein Teil des S/MAR-W die höchste Destabilisierung aufweist, folgen in S/MAR E mehrere Destabilisierungen in einem bestimmten Muster aufeinander, deren individuelle *Peaks* nicht sehr hoch erscheinen. Für das Konstrukt F3HSBTNHF, mit zwei Dimeren des cHS4-Insulators, stimmt die Vorhersage der unterschiedlichen Vorhersageprogramme auf S/MAR Charakter nicht überein. Während im MAR-Finder Profil kein Matrix-Assoziation für das GC-reiche Element vorhergesagt wird, zeigt das SIDD Profil sehr starke Destabilisierungsmuster. Aufgrund dieser widersprüchlichen Analyse wurde ein Reassoziationsexperiment durchgeführt, welches zeigt, dass der cHS4 Insulator keine Matrixaffinität und somit kein S/MAR Potential besitzt (Abb. 2.6.). Die Bindungsaffinität des cHS4-Dimers zu LIS-extrahierter nukleärer Matrix wurde in einem Scaffold-Reassoziationsversuch (1.2.3. und 4.12.) getestet, und das Ergebnis ist in Abb. 2.6. dargestellt. Die durch Stress induzierte Destabilisierung ist also ein notwendiges, aber kein ausreichendes Kriterium für Matrixbindung.

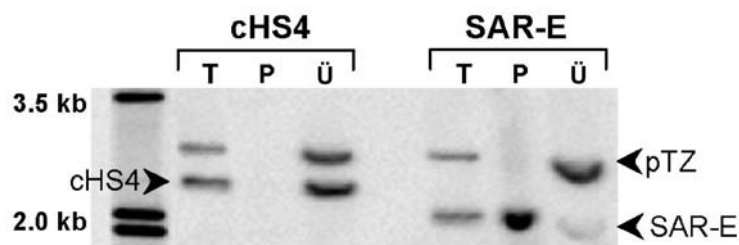


Abb. 2.6. Scaffold-Reassoziationsversuch zur Bestimmung der Matrixaffinität von cHS4. Der in vitro S/MAR-Reassoziationsversuch mit einer [³⁵S]ATP markierten 2,4 kb großen cHS4-Sequenz zeigt keine Bindung des Insulators mit der LIS-extrahierten Matrix-Fraktion (P). Als Positivkontrolle dient das zu 95% bindende S/MAR-E-Element und das pTZ Vektorrückrad zeigt als Negativkontrolle keine Bindung (T: Total/Input, P: Pellet, Ü: Überstand).

Das S/MAR-E Element aus dem humanen IFN-Gencluster diene als Positivkontrolle und mithilfe des Computerprogramms *Image Quant Version 5.0* konnte eine Bindungsstärke von 95% festgestellt werden. Als Negativkontrolle wurde das Vektorrückrad des Plasmids pTZ18R genutzt. Das cHS4 Dimer zeigte keine Bindung zu der nukleären Matrix-Fraktion (P). Dieses Ergebnis steht im Einklang zu früheren Ergebnissen, wonach der Insulator kein S/MAR Potential besitzt (Chung *et al.*, 1993), aber im Widerspruch zu Yusutzai & Felsenfeld (2004), die eine derartige Eigenschaft abgeleitet haben. Obwohl Felsenfeld in früheren Arbeiten das GC-reiche HS4 Insulator Element nie mit der Kernmatrix in Verbindung brachte, postulierte er 2004 aufgrund seiner *in vivo* MAR-Bindungsversuche in 6C2 Zellen, dass cHS4 S/MAR Charakter hat. Die Matrixassoziation von cHS4 ist laut Yusutzai & Felsenfeld von einer intakten CTCF-Bindungsstelle abhängig. In ihren Experimenten haben sie gezeigt, dass durch Ihre Extraktionsmethode CTCF bei der Matrixpräparation nicht herausgewaschen wird – somit ist cHS4 in der Lage zu binden.

2.1.3. Biomathematische Analysen zur Matrixassoziation von artifiziellen S/MAR Elementen

In der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Lipps, Universität Witten/Herdecke, wurde versucht, AT-reiche artifizielle Elemente mit S/MAR Charakter zu amplifizieren. Das Element pOCT hat einen AT-Gehalt von 58% und zeigt in biomathematischen Analysen ein starkes Destabilisierungspotential (Abb. 2.7.). Die Erstellung des SIDD-Profiles des pOCT-Fragments erfolgte auf der Internetseite von Craig Benham (WebSIDD, Bi & Benham, 2004) und das nur 937 bp lange pOCT-Fragment wurde wie empfohlen zur Berechnung seiner Destabilisierung in einen Vektor integriert. Das MAR-Finder Profil wurde unter Verwendung der gebotenen *default* Einstellungen nur vom pOCT-Fragment erstellt. In beiden Analysen zeigt sich in einem Einzelpik ein hohes Potential zur Strangtrennung bzw. der Matrixassoziation. Bei Sequenzanalysen zeigt sich eine 98%ige Homologie des pOCT-Fragments zu bakterieller DNA; bisher sind keine prokaryotischen S/MARs bekannt. Ein *in vitro* S/MAR-Reassoziationsversuch mit einer [³⁵S]ATP markierten pOCT-Sequenz zeigt keine Bindung mit der LIS-extrahierten Matrix-Fraktion (Abb. 2.7.).

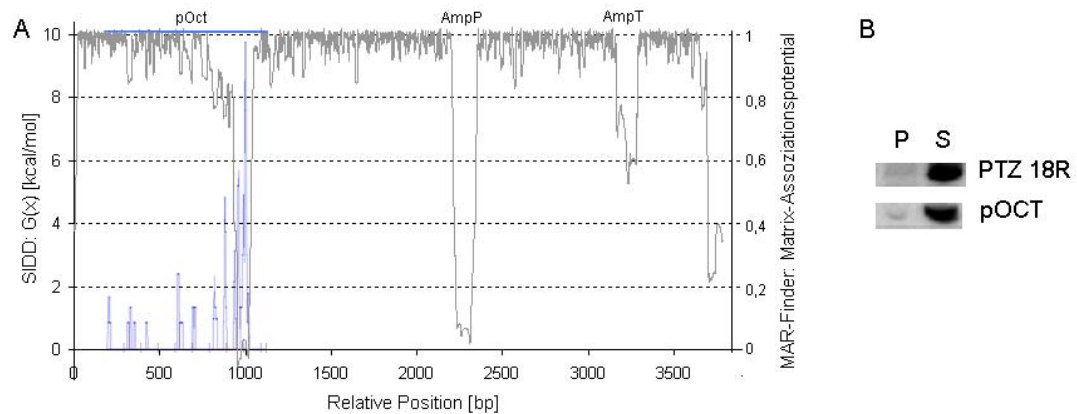


Abb. 2.7. Bestimmung der Matrixaffinität des artifiziellen S/MAR pOCT. A. Das SIDD Profil (obere Kurve) zeigt die Möglichkeit der Einzelstrangbildung als Funktion zur Basenpaarposition. Zur WebSIDD-Berechnung (Bi & Benham, 2004) wurde das nur 937 bp lange pOCT-Fragment in einen Vektor integriert. Das MAR-Finder Profil (untere Kurve, blau) wurde unter Verwendung der gebotenen *default* Einstellungen nur vom pOCT-Fragment erstellt. In beiden Analysen zeigt sich ein hohes Potential zur Strangtrennung bzw. der Matrixassoziation (AmpP: Promotor; AmpT: Terminator). B. Der in vitro S/MAR-Reassoziationsversuch mit einer [35 S]ATP markierten 937 bp langen pOCT-Sequenz zeigt keine Bindung mit der LIS-extrahierten Matrix-Fraktion (P). Die Probe zeigt genau wie das pTZ Vektorrückrad als Negativkontrolle keine Bindung (P: Pellet, S: *Supernatant*, Überstand).

Reassoziationsversuche konnten die Vermutung auf S/MAR Charakter nicht bestätigen. Ein hohes Strangtrennungspotential ist also nicht das einzige Kriterium für S/MAR-Elemente.

2.2. S/MARs innerhalb des IFN-Genclusters

Nach dem Domänenmodell ist das Chromatin einer eukaryotischen Zelle in einer Art Schlaufenstruktur organisiert, wobei die S/MAR-Elemente die Anheftungspunkte der DNA an die Kernmatrix darstellen und die Gene innerhalb der DNA-Schleife lokalisiert sind (Gasser & Laemmli, 1987; Vogelstein *et al.*, 1980). S/MAR-Elemente in großem Umfang zu mappieren und zu charakterisieren war bisher nur eingeschränkt möglich, da nur lückenhafte intergenische Sequenzen zur Verfügung standen. Durch das Voranschreiten des Humangenom- aber auch anderer Genomprojekte werden immer mehr intergenische Bereiche sequenziert und der Allgemeinheit zugänglich, auf die vorgestellten S/MAR-Vorhersagealgorithmen (vgl. 1.3.) angewandt werden können. So kann eine Vorauswahl der experimentell zu testenden Sequenzen getroffen werden.

Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der 5' und 3' vom humanen IFN α -Gen gelegenen S/MAR-Elemente, welche die Grenzen der IFN α -Domäne markieren, sind durch eine Reihe von Untersuchungen näher charak-

terisiert worden (Bode & Maass, 1988; Klehr *et al.*, 1991; Mielke *et al.*, 1990; Knopp, 2000; Götze, 2003). Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine vergleichende Analyse der Chromatinstruktur der IFN-Domäne zwischen Mensch und Maus oder Schimpanse. Der IFN-Gencluster, innerhalb dem auch die IFN α -Domäne liegt, ist ein ideales Untersuchungsobjekt für den Abgleich der Struktur der DNA in dieser Domäne mit den Ergebnissen der von Benham *et al.* entwickelten Vorhersagemethode (vgl. Kap. 1.3.1.).

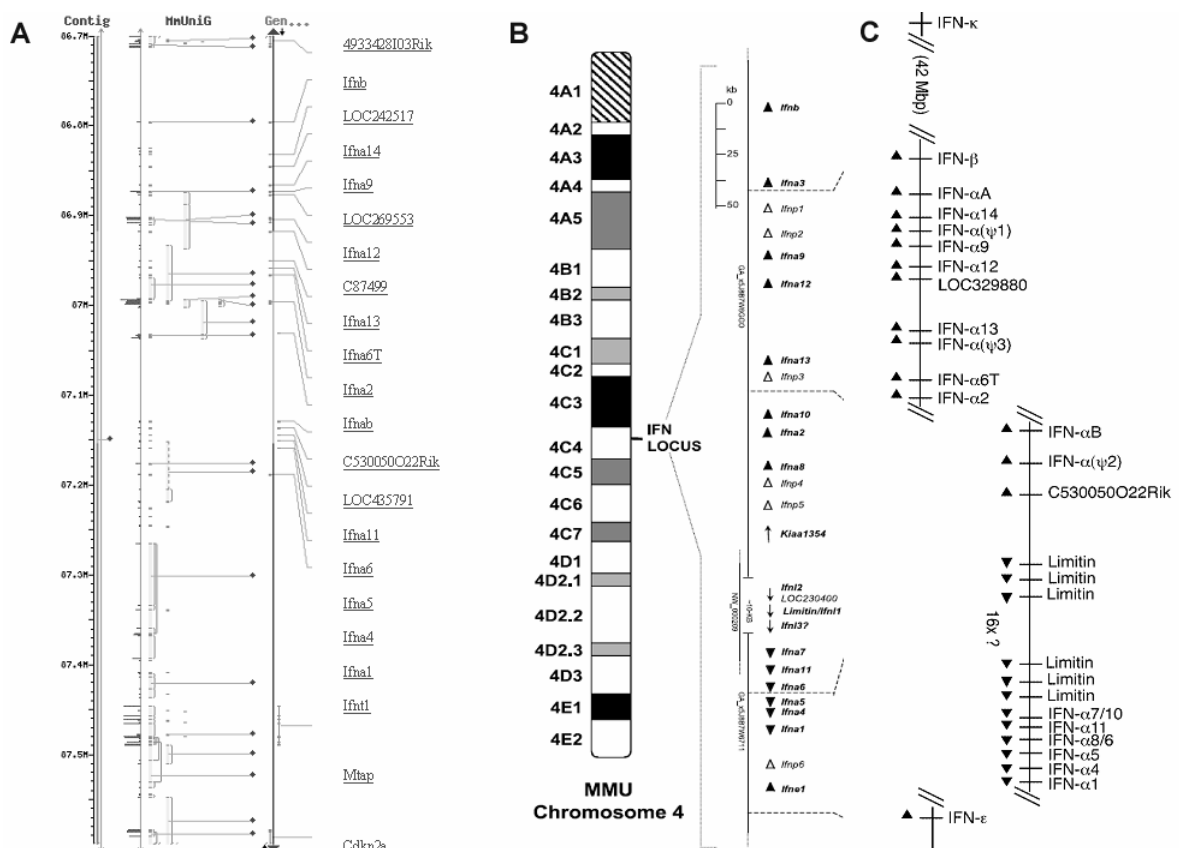


Abb. 2.8. Murine IFN Gendomäne. A) Annotierung nach NCBI Genbank vom 21.05.2005. B) Annotierung nach Hardy *et al.* (2004) inkl. muriner Pseudogene. C) Annotierung nach van Pesch *et al.* (2004).

Eine Problematik die Interferondomänen zwischen Maus und Mensch zu vergleichen besteht darin, dass bisher keine einheitliche Annotierung des murinen Genoms existiert (Hardy *et al.*, 2004). Die Lage des IFN β -Gens bei der Maus ist eindeutig geklärt, aber bei der Annotierung der IFN α -Gene gibt es Widersprüche sowohl in Position als auch in der Nomenklatur. Während in der Gendatenbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) bis zum 21.05.2005 13 Alpha-Interferongene eingetragen wurden, spricht van Pesch (2004) von 17 Genen

und nach Hardy (2004) gibt es 16 IFN α -Gene und 5 Pseudogene. Bis heute ist man sich nicht sicher, ob im murinen Organismus genau wie beim Menschen Pseudogene in der IFN Gendomäne existieren (Abb. 2.8.).

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die humane IFNB1-Domäne durch zwei starke S/MARs flankiert wird, 5'-proximal durch SARE und 3'-terminal durch SAR-I, welches ein ähnlich hohes Bindungspotential besitzt wie SARE. In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass solche Domänengrenzen organismusübergreifend konserviert sind (Abb. 2.9.).

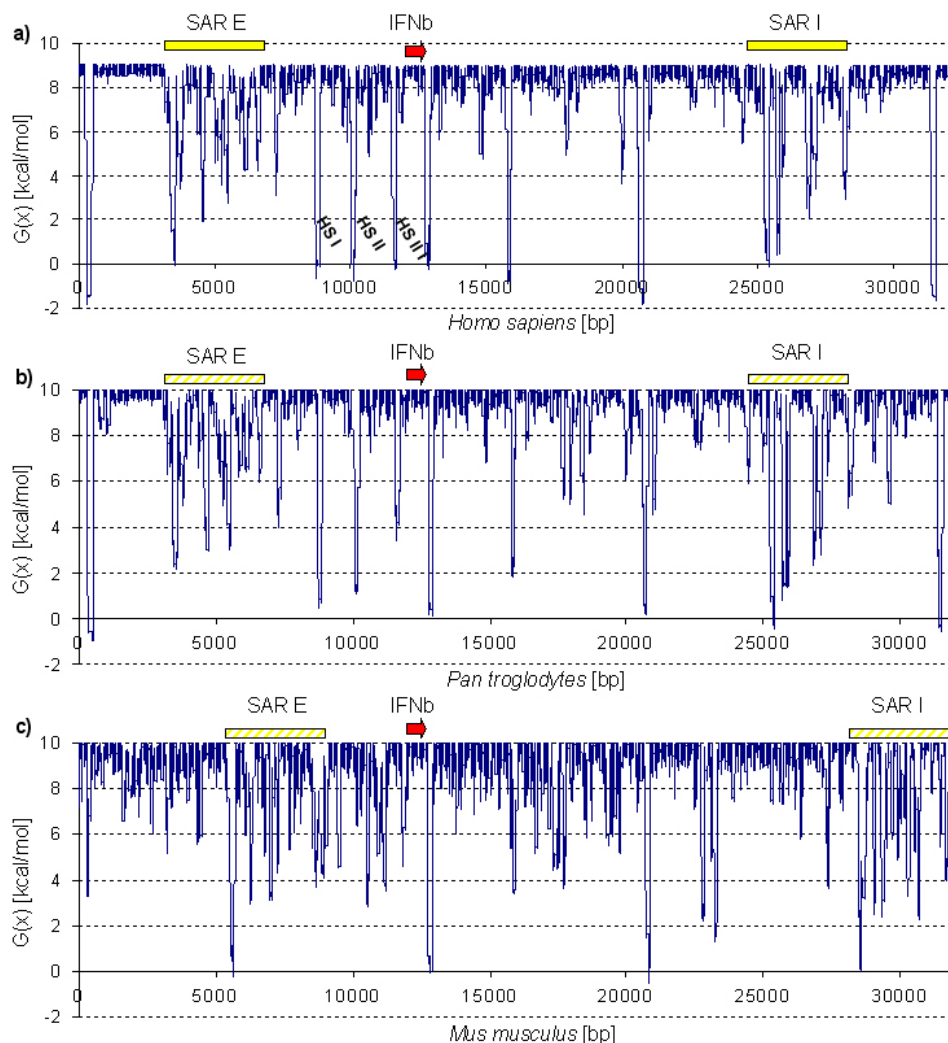


Abb. 2.9. SIDD Profil der IFN β -Region von Mensch (*Homo sapiens*), Schimpanse (*Pan troglodytes*) und Maus (*Mus musculus*). a) Menschliche IFN β -Region mit den bekannten starken S/MARs SARE und SAR I. Proximal des IFN β -Gens befinden sich die stark destabilisierten Hypersensitiven Sites HS I - III (Klar *et al.*, 2005). Die gleichen Destabilisierungsmuster findet man im SIDD Profil des Schimpansen (b), während das SIDD Profil der Maus (c) Unterschiede aufweist. Der Terminator des IFN β -Gens ist wie beim Menschen und Schimpansen stark destabilisiert, doch die drei proximal gelegenen Hypersensitiven Sites sind nicht vorhanden. Auch die Positionen von SARE und SAR I sind verschoben.

Im Vergleich der IFN β -Region von Mensch, Schimpanse und Maus erkennt man im SIDD Profile eine starke Übereinstimmung bei Mensch und Schimpanse. Nicht nur die kodierende Region, sondern auch die flankierenden Bereiche mit den bekannten starken S/MARs SAR E und SAR I sind stark konserviert. Das SIDD Profil der Maus weist dagegen mehr Unterschiede auf. Der Terminator des IFN β -Gens ist wie beim Menschen und Schimpansen stark destabilisiert, doch die drei isolierten, proximal gelegenen hypersensitiven Sites sind nicht vorhanden. Die Vermutung, dass hieraus unterschiedliche regulatorische Prinzipien resultieren, konnte durch Klar & Bode (2005) bestätigt werden. Auch die Positionen von SAR E und SAR I sind verschoben. Da S/MAR Elemente keinerlei Konsensussequenz aufweisen, geht man davon aus, dass die Sequenz dieser Elemente nicht so stark konserviert sind, wie die Sequenzen kodierender DNA-Regionen.

Die ersten S/MAR-Kartierungsexperimente der IFN-Domäne wurden mit herkömmlichen Eco RI bzw. Bgl II restriktionsverdauten Fragmenten gemacht, die *in vitro* zur Kernmatrix zugegeben wurden (Bode und Maass 1988). Die Auswahl der Fragmente ist damit zufällig und hängt von dem Vorhandensein einer passenden Restriktionsschnittstelle ab. Ein Destabilisierungspotential wird dabei nicht berücksichtigt. Generiert man daher, z.B. über PCR, Fragmente, die mit den Minima im SIDD-Profil exakt übereinstimmen, stellt man fest, dass man voneinander abweichende Bindungsdaten erhält. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 2.10. dargestellt. Die analysierte DNA-Region beinhaltet neben der kodierenden Region des IFNB1-Gens (cds) auch dessen flankierende Promotor- und Terminatorbereiche (P-B und T-B). Als komplette Sequenz zeigt das Fragment keine Matrix-Assoziation, doch dieses Erscheinungsbild ändert sich, wenn einzelne Fragmente aus dem Bereich getestet werden. Während die kodierende Region (cds) des IFN β -Gens sowohl bei Mensch, als auch bei der Maus keine Bindung zeigt, besitzt die benachbarte Promotorregion inklusive der danebenliegenden DNase I hypersensitive Site (Bode *et al.*, 2000B, Klar *et al.*, 2005) eine Affinität von 49% bzw. 75%. Am 3'-Terminus bindet die Terminatorregion (T-B) inklusive Polyadenylierungssite zu einem Prozentsatz von 79% beim Menschen, und zu 87% bei der Maus an die Kernmatrix. Diese Ergebnisse verdeutlichen folgenden grundsätzlichen Effekt: enthalten getestete S/MAR-Elemente zusätzlich DNA, die kein S/MAR-Potential besitzt, erhöht sich ihr Kernmatrix-Bindungspotential, wenn diese nicht S/MAR-Anteile entfernt

werden. Die hier dargestellten Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit von zuverlässigen Vorhersagealgorithmen, da in der Vergangenheit vor allem schwächere S/MAR-Elemente wegen einer zufälligen Auswahl der zu testenden Fragmente in Reassoziationsexperimenten nicht erkannt wurden.

Das funktionelle Gen IFN β wird von destabilisierten Fragmenten flankiert. In Abb. 2.10. ist die Korrelation zwischen Vorhersage und Reassoziationsanalyse deutlich erkennbar. Die Reassoziationsexperimente wurden im folgenden auf die WP18A10A7 Interferondomäne ausgedehnt (nach Götze, 2003). Die Ergebnisse dieser Reassoziationsversuche - *Southern Blot* Ausschnitte der *in vitro* Bindungsassays, SIDD-Profil und die statistische Auswertung der Bindungsstärken - sind in Abbildung 2.11. zusammengefasst.

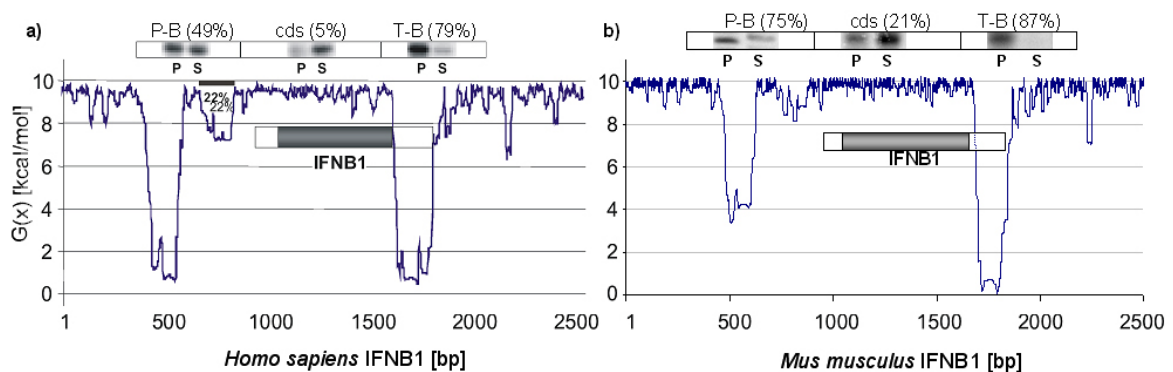


Abb. 2.10. SIDD Profile des humanen und murinen IFN β Gens im Vergleich. a) aus Götze, 2003 (Dissertation). Der Ausschnitt der direkten IFN β 1-Umgebung beim Mensch: testet man die individuellen *Peaks*, zeigt vor allem der Terminatorbereich ein starkes S/MAR-Bindungspotential. Die Bindungsdaten sind über der SIDD-Kurve aufgetragen. Der weiße Kasten symbolisiert die mRNA des IFN β 1-Gens, der graue die *cds*. b) Bei der Maus ist ein vergleichbares Destabilisierungsmuster erkennbar. P-B: Promotor; T-B: Terminator; P: Pellet; S: *Supernatant*, Überstand

Im Vergleich zwischen Mensch und Schimpanse wurden sieben individuelle SIDD-*Peaks* mit Einzelstrangbildungspotential *in vitro* mehrfach getestet, zusätzlich wurden stabile DNA-Regionen als Negativkontrollen eingesetzt. Die zu untersuchenden DNA Fragmente wurden in den pTZ18R Vektor kloniert, der gleichzeitig als nicht-bindende DNA-Kontrolle diente. Als Positivkontrolle fungierte das zu 95% bindende SAR-E Element. Tatsächlich zeigen alle vorhergesagten destabilisierten DNA-Fragmente eine Affinität zur nukleären Matrix, während stabile Bereiche nicht mit der Kernmatrix interagieren. Auffällig ist, dass die kodierenden Regionen der funktionellen IFN α -Gene jeweils von destabilisierten Fragmenten flankiert werden, wobei die Kernmatrix-Affinität der

Das spezifische Destabilisierungsmuster, vom Promotor über das Gen bis hin zum Terminator, scheint also sequenzunabhängig, über verschiedene Organismen hoch konserviert zu sein. Lokale DNA-Denaturierung ist ein bestimmender Schritt bei der Initiation von Replikation und Transkription. Bei letztgenannter erleichtert eine lokal vorhandene negative superhelikale Spannung im Promotorbereich das Binden der RNA-Polymerase an den entsprechenden DNA-Matrizenstrang. Durch das Voranschreiten der RNA-Polymerase während der Elongation wird eine Welle positiver Superhelizität vor der Transkriptionsmaschinerie und negative superhelikale Spannung dahinter erzeugt (Liu und Wang, 1987; Tsao *et al.*, 1989). Dieses Phänomen konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden. Eine Ansammlung positiver Superhelizität vor dem Transkriptionskomplex kann ein Voranschreiten der Transkription stark behindern. Eine destabilisierte 3'-Terminatorregion kann jedoch die entstehende Spannung auffangen und so zu einem schnellen Voranschreiten des Polymerase-Transkriptionskomplexes und damit zu einer effektiven Transkription beitragen. Gleichzeitig isoliert ein destabilisierter Terminator das Gen von dessen 3'-gelegenen Nachbarsequenzen, indem er eine Ausbreitung der positiven Superhelizität in umliegende DNA-Bereiche verhindert (Benham, 1996A). Solch ein Isolatoreffekt garantiert eine wirkungsvolle Termination der Transkription. Die durch die Transkription entstandene negative Superhelizität im 5'-Bereich des Transkriptionsapparates hat wiederum Einfluss auf die Promotorregion der Gene. Die negative Superhelizität kann zu einer Aufwindung der destabilisierten Promotorsequenz führen und so eine erneute Transkriptionsinitiation erleichtern.

Als Standard wurde für die Berechnung der gemessenen S/MAR-Bindungsaktivitäten bei Mensch und Schimpanse die 95%ige Bindung des SAR-E Elements zugrundegelegt. Zusätzlich zu den Bindungsstärken sind die jeweiligen Fragmentgrößen und der AT-Gehalt in der Tabelle 2.2. angeführt. Der AT-Gehalt der getesteten S/MAR-Elemente liegt in den meisten Fällen über 70%. Allerdings ist der AT-Reichtum allein nicht ausschlaggebend, um S/MAR-Eigenschaften hervorzurufen. Der AT-Gehalt von Fragment Pan-WP18-2 zum Beispiel beträgt 72%, das Fragment bindet jedoch nur sehr schwach an die Kernmatrix. Die Promotor und Terminator Regionen des Pan-IFN α -Gens weisen eine Matrixbindung von 69-84% auf. Bei den intergenischen getesteten Fragmenten liegt nur eine Bindung von durchschnittlich 45% vor. Auch das

Pseudogen WP18 wird von schwächer bindenden Sequenzen flankiert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass dieser hier präsentierte „strukturelle Code“ - destabilisierter Promotor/Terminator-Bereich und eine stabile kodierende Region – für funktionelle Gene universelle Gültigkeit hat. Bei Pseudogenen, die keinem Selektionsdruck mehr unterliegen, kann dieser Code im Laufe der Zeit verloren gehen.

Fragment	Größe [bp]	A/T-Gehalt [%]	S/MAR Bindungsaktivität [%]
<i>Standard</i>			
SAR-E	2200	69	95
<i>Pan troglodytes</i>			
Pan-WP18-1	221	76	59
Pan-WP18-2	164	72	35
Pan-P-A10	400	77	69
Pan-T-A10	441	73	84
Pan-Int-1	318	75	59
Pan-Int-2	327	69	40
Pan-Int-3	329	63	54
Pan-Int-4	289	62	43
Pan-Int-42	429	61	30

Tab. 2.2. Die S/MAR-Bindungsaktivitäten der genassoziierten destabilisierten Sequenzen beim Schimpanse (vgl. Abb.2.11). In der ersten Spalte der Tabelle ist der Fragment-Name, in der zweiten die Fragmentlängen und in der dritten der AT-Gehalt der getesteten Sequenzen aufgeführt. In Spalte vier ist die S/MAR-Bindungsaktivität der einzelnen Fragmente angegeben.

WP: Pseudogen; P: Promotor; T: Terminator; Int: intergenisches Fragment

2.3. S/MARs innerhalb der Zellkernorganisation

Der Zellkern enthält den größten Teil des genetischen Materials der eukaryotischen Zellen in Form von Chromosomen. Außerdem ist er der Ort vieler biochemischer Prozesse, wie der Expression und Replikation der Gene. Die Regulation dieser Prozesse wurde in vielseitigen biochemischen und zytologischen Studien mit Ausrichtung auf die verschiedenen molekularen Komponenten (DNA-Replikation, Transkription, RNA Synthese, DNA Reparatur, und Kernmatrix) untersucht (*Reviews*: Berezney *et al.*, 1995, Lamond & Earnshaw, 1998, Lawrence *et. al.*, 1993, Strouboulis & Wolffe, 1996). Die dreidimensionale Organisation des Genoms als zentrales Element im Zellkern und dessen Rolle bei der Regulation aller weiteren Prozesse, ist noch immer unklar. Chromosomen nehmen während der Interphase abgegrenzte Bereiche im Zellkern ein, die Chromosomen-Territorien. Hinweise, dass Chromosomen Territorien bilden, ergaben sich in den 1970er Jahren aus Experimenten, in denen Zell-

kerne mit UV-Lasern bestrahlt wurden (Zorn *et al.*, 1976). Bei diesen Versuchen wurde jeweils nur ein kleiner Teil des Zellkerns lebender Zellen bestrahlt. Wären Chromosomen im ganzen Kern zufällig verteilt gewesen, so hätten bei der Bestrahlung alle oder doch zumindest die meisten Chromosomen getroffen werden müssen. In der auf die Bestrahlung folgenden Mitose war jedoch nachweisbar, dass nur wenige Chromosomen Strahlenschäden aufwiesen. Dies sprach für eine regional begrenzte Ausbreitung der Chromosomen im Zellkern. Ein direktes Sichtbarmachen von Chromosomenterritorien gelang dann etwa zehn Jahre später mit Hilfe der „*In situ* Hybridisierung“ (Schardin *et al.*, 1985, Manuelidis, 1985). Die Verteilung des Chromatins und somit der Chromosomen innerhalb des Zellkerns erscheint auf den ersten Blick zufällig, seit den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts konnten jedoch einige Ordnungsprinzipien gefunden werden. Die DNA-Replikation erfolgt während der Zellzyklus S-Phase nicht gleichmäßig, sondern an manchen Stellen der Chromosomen früher, an anderen später. Frühe oder späte Replikation sind dabei Eigenschaften, die für alle Abschnitte der Chromosomen in einem gegebenen Zelltyp konstant sind. Es stellte sich heraus, dass sich früh replizierte Bereiche vorwiegend im Inneren des Kerns befinden, während spät replizierte Bereiche vorwiegend an der Kernhülle und um die Nucleoli herum lokalisiert sind (O'Keefe *et al.*, 1992). Für die Anordnung der Chromosomenterritorien im Zellkern wurde beobachtet, dass Chromosomen mit hoher Gendichte bevorzugt in der Mitte des Kerns liegen während Chromosomen mit niedriger Gendichte häufiger an der Peripherie zu finden sind. Für manche Zelltypen wurde auch beschrieben, dass kleine Chromosomen eher in der Mitte liegen während sich große außen befinden (Cremer & Cremer, 2001).

In der Arbeitsgruppe um Denise Sheer, Cambridge UK, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt: in Mausfibroblasten wurde Chromosom 6 komplett, und der darauf lokalisierte Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Nach IFN γ -Induktion war ein Ausloopen des MHC Klasse II Clusters in die Interchromatindomäne zu beobachten, wodurch die zu transkribierenden Gene dem Transkriptionsapparat zugänglich werden (Volpi *et al.*, 2000).

IFN β ist ein Zytokin, welches in der frühen Phase der Immunantwort (*innate response*) als Reaktion z.B. auf eine Virusinfektion gebildet wird. Nach Aktivierung des IFN- β -Promotors durch verschiedene Transkriptionsfaktoren

wird IFN- β produziert. IFN- β bindet an den Typ-1 IFN-Rezeptor und induziert eine Reihe antiviraler Gene, welche die Zelle in einen antiviralen Zustand versetzen und vor Infektion schützen können.

So wie die Aktivierung des MHC Klasse II visualisiert wurde, sollte auch die Aktivierung von IFN im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Murine Fibroblastenzellen (NIH 3T3) wurden auf Objektträger fixiert (vgl. 4.12, 4.13) und mit einer Fluoreszenz-Sonde des Chromosoms 9 hybridisiert. Somit wird das gesamte Chromosom 4, auf welchem das IFN-Gencluster lokalisiert ist, angefärbt und die Chromosomenterritorien werden sichtbar. (Abb. 2.12.)

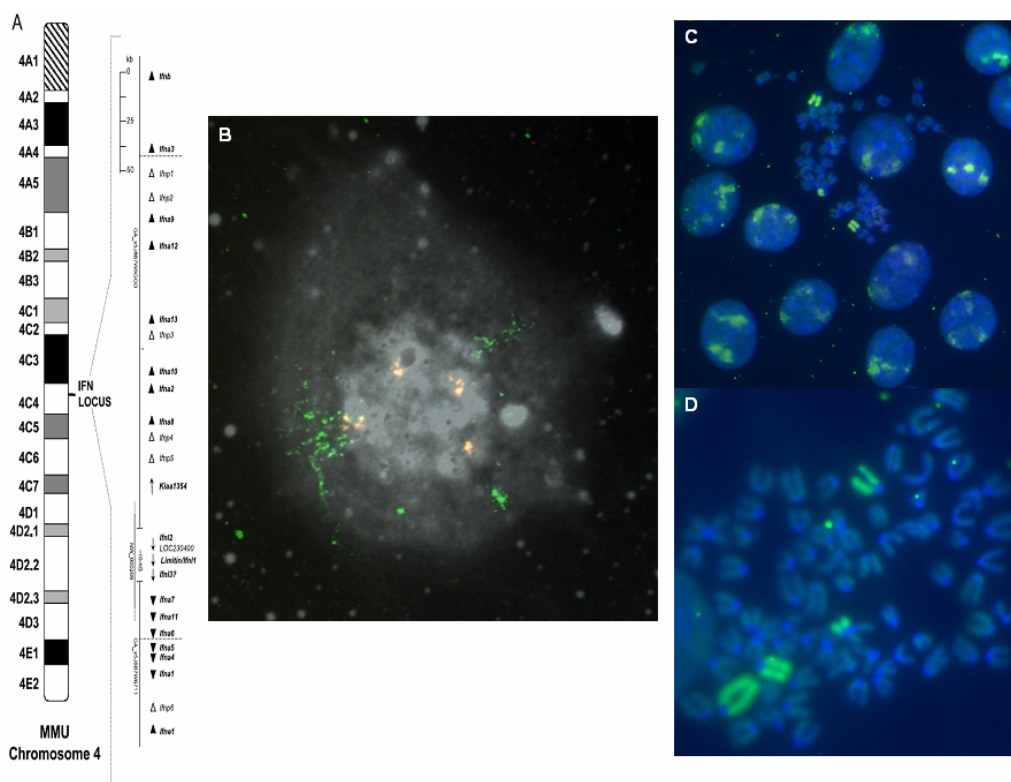


Abb. 2.12. Murine NIH 3T3 Fibroblastenzellen (tetraploid). A) Schema des murinen Chromosoms 4 mit Übersicht der IFN Genclusters. B) Halo-FISH Präparation eines NIH 3T3 Zellkerns (Sonden: IFN α = SpectrumGreen, IFN β = SpectrumRed). C+D) komplette und aufgesprungene Zellkerne in Metaphase (Sonde: mChromosom 4 = SpectrumGreen). DNA wurde mit DAPI angefärbt.

Die murine NIH 3T3 Zelllinie ist tetraploid; jedes Chromosom liegt in vierfacher Ausführung vor. Polyploidie entsteht oft in Folge von Zellkultur und wie bei vielen immortalisierten Zelllinien, kam es auch bei der NIH 3T3 Zelllinie zu einer chromosomalen Translokation. In Abbildung 2.12.A ist die Halo-FISH Präparation eines NIH 3T3 Zellkerns dargestellt. Man erkennt deutlich die Kernmatrix im Zentrum mit der darumliegenden DNA-Halo. Das Interferon-

Alpha-Gencluster (IFN α 4-IFN α 13) wurde mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs grün angefärbt und ist in der Präparation in der Halo lokalisiert. Im Gegensatz dazu befindet sich die IFN β -Region (rot) an der nukleären Matrix. Der Bruchpunkt der Translokation eines Chromosoms 4 befindet sich zwischen IFN α 13 und IFN β und das IFN α -Cluster ist hinter den gleichen Genort des Chromosomenpartners transloziert. Dies wird sowohl in Abbildung 2.12.B als auch in D deutlich. In Abbildung D erkennt man vier komplett angefärbte Chromosomen 4. Zwei Chromosomen haben die gleiche Größe, während ein weiteres kleiner und das vierte verlängert erscheint.

Um im Weiteren Schwierigkeiten, die sich durch die Tetraploidie der NIH Zellen ergeben könnten zu umgehen, wurden die folgenden Versuche an FS4-Zellen durchgeführt. Dieses ist eine diploide, primäre Fibroblastenzelllinie aus menschlichen Vorhautzellen. Nach Induktion der IFN- β Produktion durch Viruszugabe (vgl. 4.10.5.) wurden Zellkerne auf Objektträgern fixiert. Chromosom 9, auf dem das IFN-Gencluster lokalisiert ist, wurde mit SpectrumGreen grün angefärbt um die Chromosomenterritorien sichtbar zu machen. Gleichzeitig wurden die Präparate mit einer rot fluoreszierenden Sonde aus dem Gemisch der humanen IFN-BACs bA113D19 und bA380P16 hybridisiert (Abb. 2.13.). Die Hybridisierungen mit dem Sondengemisch aus humanen IFN-BACs zeigen eine Lokalisierung des IFN-Genclusters im Randbereich des Chromosomenterritoriums 9. Ein Ausloopen der Region in die Interchromatindomäne nach der Virusinduktion konnte nicht dokumentiert werden.

Im Unterschied zum MHC-Cluster ist die Interferondomäne viel kleiner und die Auflösung des benutzten Fluoreszenzmikroskops könnte nicht ausreichend sein. Außerdem sollte in Betracht gezogen werden, dass mikroskopisch nur eine Aufsicht der Präparate ausgewertet wird. Signale, die im Bereich der Chromosomenterritorien liegen, werden möglicherweise als gebundene Signale gewertet, obwohl sie nur in den DNA-Schleifen direkt darüber liegen. Dieser über den Chromosomenterritorien liegende DNA-Bereich ist jedoch wegen der dünnen Schichtdicke mikroskopisch nicht hinreichend auflösbar, so dass auch über Techniken wie der konfokalen Mikroskopie Signale, die an die Kernmatrix gebunden sind, nicht von darüber liegenden Signalen in der DNA-Halo unterschieden werden können.

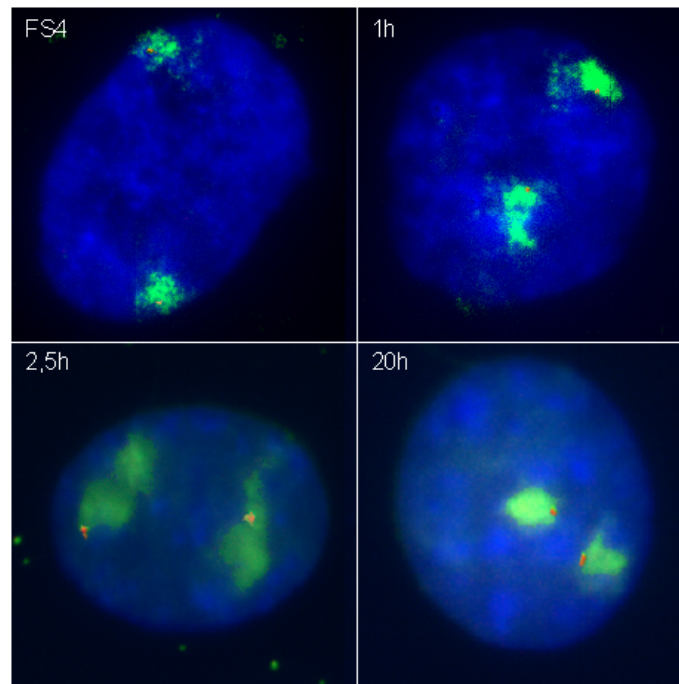


Abb. 2.13. FS4 Zellkerne. Chromosomenterritorien des Chromosoms 9 in grün, IFN-Gencluster in rot angefärbt. Hybridisierungen vor Virusinduktion und nach 1h, 2,5h und 20 h. Das IFN-Gencluster ist immer im Randbereich des Chromosomenterritoriums lokalisiert.

Ein weiterer Erklärungsansatz für das „nicht Ausloopen“ der IFN-Region im beschriebenen Versuch, ist der „*potentiated state*“. Gene, die transkribierbar sind, werden nicht gezwungenermaßen aktiv transkribiert. In diesem Fall wäre klar, dass die kodierende Region nicht in das Interchromatin-kompartiment ausloopt.

2.4. S/MARs als Integrationsort für Viren

Der Lebenszyklus eines Retrovirus besteht aus fünf Schritten: Infektion der Zelle, reverse Transkription, Überwindung der Kernhülle, Integration ins Wirtsgenom, Expression und Viruspartikelbildung. Die Integration der proviralen DNA ins Wirtszell-Genom ist ein essentieller Schritt für das Überleben eines Retrovirus (Hematti *et al.*, 2004). Der Prozess beginnt, nachdem das Retrovirus in eine Zelle eingedrungen ist, und sein RNA-Genom in doppelsträngige DNA umgewandelt wurde. Die reverse Transkription läuft im Capsid ab. Zur Integration der DNA in die Wirts-DNA muss sie nun in den Zellkern verbracht werden. Die doppelsträngige DNA-Kopie, flankiert von diesen LTRs, wird in den Zellkern eingeschleust. Der Eintritt in den Zellkern erfordert die Abwesenheit der Kernmembran und ist daher auf aktiv sich teilende Zellen eingeschränkt. Lentiviren gehören zur Klasse der Retroviren und bieten den Vorteil

durch spezielle Proteine in ihrer Matrix auch ruhende Zellen zu infizieren. Verschiedene Rezeptoren in der Virushülle entscheiden darüber, welche Zellen infiziert werden. So besitzt das bekannteste Lentivirus, das *Human Immuno-deficiency Virus* (HIV), einen Liganden für den CD4 Rezeptor, mit dem es humane T-Zellen effektiv infizieren kann (Bushman *et al.*, 2005). Verschiedene Lentiviren besitzen spezielle Bindungsproteine, die Potential für eine gentherapeutische Anwendung besitzen. Alle Retroviren besitzen die drei Gene *gag* (*group specific-antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*), welche für die Virusproduktion essentiell sind. Das *gag*-Gen enthält die Information für die viralen Kernproteine, *pol* kodiert für die Enzyme reverse Transkriptase und Integrase, und *env* kodiert die Rezeptorbindungsproteine. *Env* ist somit für den Kontakt und die Fusion mit der Zelloberfläche der Wirtszelle nötig. Einmal im Zellkern angelangt, liegt die virale DNA, flankiert von zwei identischen LTRs, als lineares Molekül vor. Die virale Integrase vermittelt die Integration der proviralen DNA in das Genom der Wirtszelle. Dazu werden schon im Präintegrationskomplex die beiden terminalen Basen von den 3'-Enden durch die virale Integrase entfernt. Bis heute ist unklar, ob diese Funktion von der viralen Integrase selbst oder durch ein zelluläres System ausgeführt wird. Die integrierten Proviren werden wegen der stabilen Integration in das zelluläre Genom weitervererbt.

Lange glaubte man, dass die Integration in das Genom der Wirtszelle zufällig erfolgt, allerdings scheinen aktiv transkribierte Bereiche etwas bevorzugt zu werden (Mooslehner *et al.*, 1990; Rohdewohld *et al.*, 1987; Scherdin *et al.*, 1990; Vijaya *et al.*, 1986). Neuere Studien zeigen zudem schwache Präferenzen von bestimmten Retroviren bei der Integration. Während das Avian Leukosis-Sarcoma Virus (ALV) eine leichte Präferenz für die Integration in Gene zeigt (Mitchell *et al.*, 2004; Narezkina *et al.*, 2004) und das Humane Immundefizienzvirus (HIV) präferentiell in aktive Gene inseriert (Schroder *et al.*, 2002), scheinen MLVs die Promotorregion aktiver Gene zu bevorzugen (Wu *et al.*, 2003). Bei MLV entfallen 20,2% aller Integrationen in eine Transkriptionsstart-Region (± 5 kb). Dies würde bei einer völlig zufällige Insertion in das Genom nur in 4,3% der Fälle auftreten (Wu *et al.*, 2003).

Auch die Sequenz an der Integrationsstelle scheint von Bedeutung zu sein, da im Integrationsbereich der drei genannten Retroviren bestimmte präferierte Basen ausgemacht werden konnten (Holman & Coffin, 2005). Trotz

intensiver Untersuchungen sind die Mechanismen für die Selektion von Zielsequenzen noch nicht genau verstanden. Der Zugang zur DNA scheint einen wesentlichen Einfluss zu haben, da Integrationen vor allem im offenen Chromatin zu finden sind und nur sehr selten im Heterochromatin der Centromere. Da aber verschiedene Retroviren unterschiedliche Präferenzen für ihre Integration zeigen, kann dies nicht der einzige Mechanismus sein.

Es wird spekuliert, ob virusspezifische Interaktionen mit Wirtsproteinen ebenfalls eine Rolle spielen. S/MAR-Elemente sind DNA-Bereiche, die als Anheftungsstellen des Chromatins an die Kernmatrix dienen. Die Zusammensetzung des Kerngerüsts aus strukturellen und regulatorischen Proteinen legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Kernmatrix als Plattform für diverse Prozesse dient, die DNA, RNA und Proteine räumlich miteinander verbindet. Eine zunehmende Anzahl an identifizierten Kernmatrix-Proteinen scheint regulatorische und strukturelle Funktionen miteinander zu vereinen. Retroviren nisten sich in ihrer DNA-Zwischenstufe in diese spezifischen Stellen im Genom ein, um ihrer eigenen Vermehrung zu verstärken, da die Viren zelluläre Mechanismen für ihre Vermehrung ausnutzen.

Es war von Interesse, den Integrationsort von Retroviren dahingehend näher zu charakterisieren, ob S/MAR-Charakter vorliegt und S/MARs ein übergeordnetes Kriterium für die Integration viraler DNA ins Genom sind. Die Halo-FISH Analyse ist eine neue Hybridisierungsmethode zur Charakterisierung von S/MAR-Elementen, wobei Schlaufenstrukturen (Halos) und Matrixbindung in der Zelle visualisiert werden können (Abb.2.14.). Als Sonde diente im Folgenden ein Plasmid mit entsprechender Virussequenz, welches mittels Nick-Translation mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff markiert wurde.

Am DPZ, Göttingen wurden humane Lymphozyten (C8166) akut mit dem Simianen Immunodefizienzvirus der Makaken SIVmac32H infiziert und durch I-PAP Anfärbung zeigten sich ca. 25% der Zellen positiv. Durch Halo-FISH-Untersuchungen konnten bei etwa 20% der Zellen eine einzelne Integration des Virus nachgewiesen werden, wobei der Integrationsort immer an der Kernmatrix liegt (s. Abb.2.14.). Für die Integration lentiviraler DNA ins Wirtsgenom liegt also eine signifikante Favorisierung an S/MAR-Regionen vor.

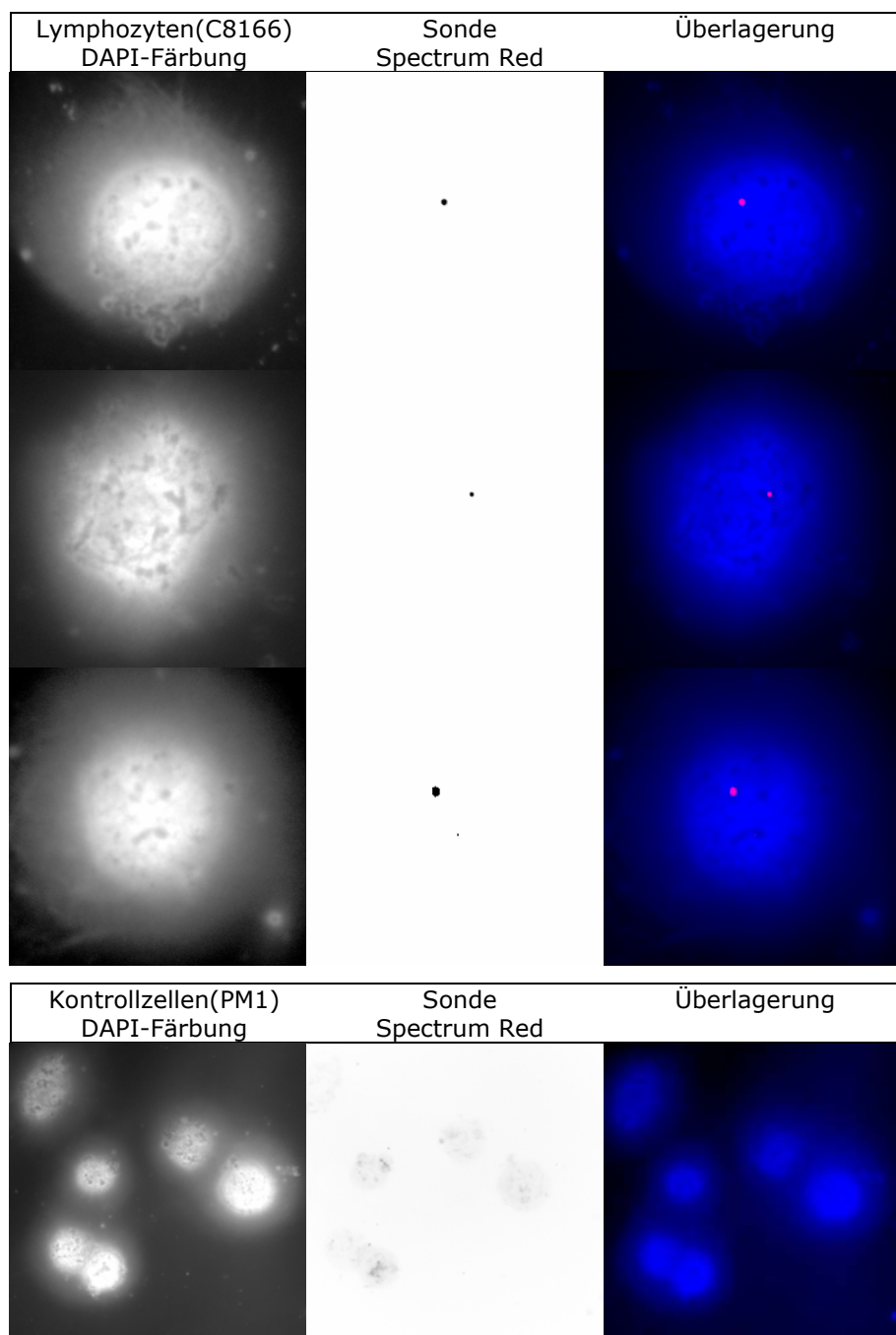


Abb. 2.14. Humane Lymphozyten (C8166) mit SIVmac32H infiziert. Durch Halo-FISH-Untersuchungen konnte bei etwa 20% der Zellen eine Einzelintegration des Virus nachgewiesen werden, und diese erfolgte in diesen Fällen immer an der Kernmatrix. Als Sonde diente ein Plasmid mit entsprechender Virussequenz, welches mittels Nick-Translation mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff *SpectrumRed* (Vysis) markiert wurde. Als Kontrolle diente die humane Lymphozyten-Zelllinie PM1.

Erste Hinweise, dass der Integrationsort bei retroviraler Infektion nicht zufällig ist, wurden bereits von Mielke et. al. 1996 geliefert; dort wurde eine Präferenz für S/MAR-Elemente als Integrationsort beobachtet.

3. Diskussion

Chromatin liegt im Zellkern in Form unabhängiger Domänen vor, die Struktur- und Funktionseinheiten des Genoms darstellen. Diese Organisationsform erfordert komplexe Interaktionen von Strukturproteinen der Kernmatrix mit DNA-Sequenzen, die häufig aus S/MAR (scaffold/matrix attachment region)-DNA bestehen. Die Funktion der Kernmatrix ist in der topologischen Organisation des intakten Genoms und in der Verankerung makromolekularer Komplexe des DNA- und RNA-Metabolismus im Zellkern zu sehen. Die Grenzen zwischen diesen Domänen sind mit unterschiedlichen Elementen assoziiert, wie den genannten S/MARs und/oder Insulatoren: es sind Fälle bekannt, in denen beide Funktionen gleichermaßen vorliegen (Antes *et al.*, 2001, Nabirochkin *et al.*, 1998). S/MARs werden oftmals als spezielle Gruppe cis-agierender Elemente angesehen, deren Fähigkeit zur Transkriptionssteigerung sich von der Wirkungsweise von *Enhancern* unterscheidet. Aufgrund des entscheidenden Einflusses der angrenzenden Chromatinstrukturen auf die Expression eines Gens, wurden viele Studien zum Vergleich dieser Grenzstrukturen durchgeführt (Baer & Bode, 2001; Götze *et al.*, 2005) (vgl. Abb. 2.2.).

3.1. Grenzstrukturen und ihre Matrix-Assoziation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Doppel-S/MAR Konstrukte mit einem Duplex-Insulator-Konstrukt an fünf verschiedenen definierten genomischen Integrationsorten miteinander verglichen (Abb. 2.2.). Die Ergebnisse aus diesen Experimenten weisen darauf hin, dass sowohl der cHS4-Insulator, als auch die S/MAR-EW Sequenzen eine Transkriptionssteigerung vermitteln. Wie systematische Untersuchungen ergeben, wird der Integrationsort von transkriptionshemmenden Effekten abgeschirmt. Bei den Intergenischen Sequenzen mit hohem DNA-Destabilisierungspotential (IS) stellt sich eine andere Situation dar: diese Elemente bilden keine Barriere gegenüber transkriptionshemmenden Effekten.

Die EW-S/MAR-Elemente haben an den vier Integrationsorten N40, N7, N33 und N1 für eine nahezu 100%ige Abschirmung gesorgt. Bei dem cHS4-Insulator als Grenzstruktur war hingegen eine etwas höhere Variation erkennbar. Nur am Integrationsort N40, der im ursprünglichen Zustand den niedrigsten Expressionslevel zeigte, war der Insulatoreffekt unter cHS4-Einfluß

erkennbar. Diese Unterschiede deuten auf unterschiedliche Wirkungsweisen der beiden Grenzstrukturen hin.

Bindungsmodell von S/MARs und cHS4

Wenn eine neutrale Sequenz in der Nähe eines S/MAR-Elements ins Genom integriert, wird die Wirkung zwischen endogenem Chromatin und dessen Kernmatrix-Bindungspartnern nicht beeinflusst. Entsprechend dem Modell von Heng *et al.* (2004, Bode *et al.*, 2003) wird diese Wechselbeziehung verstärkt, wenn das Integrationskonstrukt S/MAR Elemente enthält. In Abbildung 2.3. werden diese Ergebnisse dargelegt.

Im Fall von cHS4 zeigen die Halo-FISH Analysen eine verminderte Matrix-Assoziation. Es wurde gezeigt, dass cHS4-Konstrukte durch Nukleophosmin (Interaktionspartner von CTCF) an die Oberfläche von Nukleoli gebunden werden (Yusufzai & Felsenfeld, 2004). Der größte Anteil Nukleophosmin ist im granulären Anteil des Zellkerns lokalisiert, ein Teil ist jedoch gemäß seiner Transportfunktion von der Außenseite zugänglich. Wird diese Transportfunktion von cHS4 benötigt, erfolgt eine Bindung, durch die sich ein Insulator-Effekt ergibt. Bei CTCF als Bindungspartner erfolgt eine Bindung an die Nukleolusoberfläche. In diesem Fall kann eine *Enhancer-Blocking* Funktionen resultieren. Obwohl Nukleophosmin als Kernmatrix-Protein beschrieben wurde, scheint die Wechselwirkung zu CTCF einer Hochsalzextraktion (4.12.2) nur bedingt standzuhalten (vgl. Abb. 2.4.). Wir konnten zeigen, dass nach einer 2 M NaCl-Extraktion nur noch kleine Mengen CTCF in der Nähe von Nukleoli im Zellkern nachweisbar sind. Auch Dunn *et al.* (2003) haben gezeigt, dass nur 21,2% der 155-kDa CTCF Isoform an die Kernmatrix gebunden sind.

Obwohl die Annahmen von Yusufzai und Felsenfeld (2004) nach der sich die Bindung von CTCF und dem Insulator möglicherweise von der Bindung anderer Komponenten zur Kernmatrix unterscheiden, mit unseren Ergebnissen konform geht, ergeben sich Unstimmigkeiten bezüglich der Nachweismethoden. In Abbildung 2.3. und Tabelle 2.1. wird gezeigt, dass cHS4 nur teilweise an die Kernmatrix bindet. Diese Ergebnisse erklären sich dadurch, dass die Matrix-Bindung des cHS4 Elements CTCF abhängig ist, was auch schon früher in der Literatur beschrieben wurde (vgl. Chung *et al.* 1993). Auch die Reassoziationsdaten in Abbildung 2.6. zeigen, dass die Affinität von cHS4 zur Kernmatrix im Vergleich zu S/MAR gegen Null geht. Für cHS4 wurde von Felsenfeld und Kollegen (Recillas-Targa *et al.*, 2002) gezeigt, dass zwei Insulator Eigen-

schaften erfüllt werden. Es verhindert die Wirkung externer *Enhancer* auf einen Promotor, wenn das Element zwischen den beiden Faktoren platziert ist (*Enhancer-Blocking*) und cHS4 agiert als Barriere bei Chromosomalen Positionseffekten (CPE), wenn ein es einen stabil integrierten Reporter einschließt. Für diese Effekte wird eine CTCF Bindungsstelle im cHS4 verantwortlich gemacht, doch in dieser Arbeit scheint es so, dass die Grenzfunktionen durch einen alternativen Mechanismus erreicht werden. Dieser mag von ähnlicher Art sein wie jener der humanen intestinalen Apolipoprotein B Domäne, welche auf herkömmlichen S/MARs und Insulatoren beruht: während ein 3'S/MAR die Rolle eines Insulators erfüllt, unterstützt ein zusätzliches 5' gelegenes CTCF die Insulation. Es wurde impliziert, dass sich durch die wechselseitigen Interaktionen zwischen diesen Elementen die alternativen Domänenstrukturen in Leber und Darmtrakt erklärt (Antes *et al.*, 2001).

Eine weiteres Modell, die partielle Funktion von cHS4 Elementen zu erklären, basiert auf dem „*active chromatin hub*“-Konzept (Patrinos *et al.*, 2004). Demzufolge interagieren aktive Gene physikalisch im nukleären Raum mit *cis*-regulierten Elementen, wodurch inaktive Gene *ausloopen*. Palstra und Kollegen haben gezeigt, dass das humane β -Globulin HS4-HS5 Insulator Fragment mit anderen hypersensitiven *Sites* des Genortes interagiert, welche alle in der Lage sind, CTCF zu binden (Palstra *et al.*, 2003). Diese Interaktion könnte speziell bei Kompartimenten mit aktiver RNA Polymerase II Transkription relevant sein und böte eine weitere Erklärung für die Insulatorfunktion von cHS4 Grenzstrukturen wäre.

Matrixassoziation von artifiziellen S/MAR Elementen

Prokaryoten besitzen aufgrund ihrer Organisationsstruktur keine S/MAR-Elemente. Es existieren jedoch begrenzte DNA-Bereiche, deren Erscheinungsbild im SIDD-Profil an eukaryotische, destabilisierte Sequenzen (UEs) erinnert. Solche Elemente sind unter anderem der Ampicillin-Promotor bzw. Terminator. Anscheinend ist es wichtig, dass in destabilisierten Bereichen bestimmte Nukleotid-Verteilungsmuster auftreten mussten, damit Kernmatrix-Proteine binden können.

Solche spezifischen Sequenzmuster können zum einen identifiziert werden, indem eine ausreichend große Menge an S/MAR-Elementen charakterisiert und miteinander verglichen wird (Michalowski *et al.*, 1999), zum anderen besteht die Möglichkeit, artifizielle S/MARs mit unterschiedlichen Sequenzmo-

tiven herzustellen (Tsutsui, 1998; Bode *et al.*, 2006). Vergleicht man die Genome unterschiedlicher Organismen miteinander, so findet man eine spezifische Anreicherung von Homopurin-Homopyrimidin Wiederholungen im Genom von Eukaryoten. Im Genom von Prokaryoten dagegen sind solche Sequenzmotive unterrepräsentiert (Cox & Mirkin 1997). Symmetrische Sequenzwiederholungen stellen in Prokaryoten fast niemals eine direkte Wiederholung dar, sondern sind als *inverted repeats* angeordnet. Bei Eukaryoten handelt es sich bei Sequenzwiederholungen dagegen in hohem Maße um Homopurin-Homopyrimidin *mirror repeats*. Weiterhin unterscheidet sich der GC-Gehalt der in den verschiedenen Organismen gefundenen Sequenzmotive signifikant. Der GC-Gehalt prokaryotischer Sequenzwiederholungen entspricht dem der durchschnittlichen DNA-Zusammensetzung. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei prokaryotischer DNA „*unwinding elements*“ keine hinreichende Voraussetzung für die Existenz von S/MAR-Elementen sind (Abb. 2.7.). Ein genauer Vergleich der Unterschiede in der molekularen Zusammensetzung der UEs kann in Zukunft helfen, das Aktivitäts- und Wirkprinzip von S/MAR-Elementen in Eukaryoten besser zu verstehen.

3.2. S/MARs innerhalb des IFN-Genclusters

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eindeutig bewiesen werden, dass in Eukaryonten ein hohes SIDD-Destabilisierungspotential auch ein hohes Kernmatrix-Bindungspotential reflektiert. S/MAR-Bindungsversuche in der gesamten Region des Interferon-Genclusters haben diese Assoziation bestätigt (Abb. 2.10., 2.11.). Dass sowohl Promotor- als auch Terminatorbereiche einen S/MAR-Charakter aufweisen, lässt sich auch durch die Zusammensetzung der Kernmatrix begründen. Damit ein Gen exprimiert wird, müssen sowohl die RNA-Polymerase als auch andere Transkriptionsfaktoren einen Zugang zur DNA haben. Diese Komponenten der Transkriptionsmaschinerie sind in Eukaryonten im Interchromatin-Kompartiment bzw. an der Kernmatrix lokalisiert (Lewis *et al.* 1984, Bode *et al.* 2000A). Transkriptionell aktive Gene müssen dementsprechend einen Zugang zur Kernmatrix haben (Gasser und Laemmli 1986), was am besten über flankierende S/MAR-Elemente erreicht wird. Allem Anschein nach ist ein destabilisierter Terminator Voraussetzung für eine aktive Transkription. Nach dem Modell von Bode *et al.* Kommt es zu einem hohen Anteil aufgestauter positiver Superhelizität, wenn die Transkriptionsenzyme entlang der DNA-Doppelhelix arbeiten. In Bereichen mit hohem Einzelstrang-

bildungspotential kann diese Energie abgefangen werden. Ob das Destabilisierungspotential bei den Pseudogenen im Laufe der Evolution verloren gegangen ist oder ob sie aufgrund fehlender Destabilisierungseigenschaften niemals funktionell waren, kann im Nachhinein nicht eindeutig beantwortet werden. Man nimmt aber an, dass flankierende Elemente der IFN-Pseudogene vormals Destabilisierungspotential besessen haben, dieses Potential aber aufgrund eines fehlenden Selektionsdrucks im Laufe der Evolution teilweise verlorengegangen ist. Das Fehlen flankierender destabilisierter DNA-Elemente ermöglicht es somit, funktionelle Gene von Pseudogenen zu unterscheiden.

Ein Teilaspekt dieser Arbeit betraf die Übertragbarkeit der biochemischen Daten der humanen IFN-Domäne auf den entsprechenden murinen Sequenzabschnitt. Wie in Abbildung 2.8 gezeigt, existiert bis heute keine einstimmige Annotierung des murinen IFN-Genclusters. Gerade im Hinblick auf die Auswertung der DNA-Informationen, die sich im Laufe der Sequenzierung des Genoms angesammelt haben, bietet das Destabilisierungsprofil Möglichkeiten in der Definition funktioneller DNA-Bereiche. Es existieren unterschiedliche Ansätze, um kodierende Sequenzen im Genom vorherzusagen. Die meisten Vorhersagemodelle basieren dabei auf der Primärsequenz, wie zum Beispiel das Programm *PromoterInspektor* von Genomatix, welches nach typischen Promotor- und Enhancerelementen sucht (Scherf *et al.*, 2000). Dieser Ansatz ermöglicht es nicht, funktionelle Gene von Pseudogenen zu unterscheiden, was zu falschen Annahmen in der Genvorhersage führen kann. Zieht man zu solchen Primär-Sequenzanalysen Destabilisierungseigenschaften hinzu, eröffnet sich die Möglichkeit, Genvorhersagen zu präzisieren und zu vervollständigen. Somit kann ein *screening* nach neuen, nicht charakterisierten Genen gezielter durchgeführt werden.

3.3. S/MARs innerhalb der Zellkernorganisation

Die Lage der Chromosomen-Territorien zueinander scheint in individuellen Zellen nicht starr festgelegt zu sein, sondern ist von Zelle zu Zelle etwas verschieden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Territorien willkürlich im Inneren des Zellkerns verteilt sind. So findet man zum Beispiel bei Weizen und anderen Pflanzen eine sogenannte „Rabl-Konformation“ der Chromosomen, bei der alle Zentromeren an einer Seite des Kerns an der Kernhülle angelagert sind und alle Telomere an der anderen Seite (Gonzalez-Melendi *et al.*, 2000). In tierischen Zellen wird eine solche Anordnung nicht beobachtet, aber auch

hier sind die Chromosomen in einer bestimmten Weise angeordnet. Dies zeigt sich zum Beispiel in einem direkten Vergleich der Chromosomen 18 und 19, die ähnliche Größe besitzen und daher auch vergleichbar große Territorien einnehmen (Croft *et al.*, 1999). Die beiden Chromosomen unterscheiden sich in der Anzahl aktiver Gene, die beim Chromosom 18 viel höher ist als bei Chromosom 19. Werden die Chromosomen durch *in-situ*-Hybridisierung sichtbar gemacht, befindet sich Chromosom 18 bevorzugt in der Nähe des Kernrandes, während Chromosom 19 tief im Innern des Zellkerns zu liegen kommt. Offenbar ist also der Ort eines Chromosomen-Territoriums von dessen Aktivität abhängig; je mehr aktive Gene vorliegen, desto eher ist das entsprechende Chromosom in der Nähe des Kernrandes lokalisiert. Gunter Blobel stellte 1985 als erster die Hypothese über das sogenannte „*gene gating*“ auf, wonach in höher organisierten Eukaryoten definierte dreidimensionale Strukturen im Zellkern bestehen, und die Transkription von Genen in der Nähe von Kernporen stattfindet. Andere Befunde scheinen zu belegen, dass (mit Ausnahme von Hefe), dass das Heterochromatin mit seinen genetisch inaktiven chromosomalen Regionen in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert ist. Die einzelnen Chromosomen-Territorien scheinen voneinander durch einen DNA-freien Raum getrennt zu sein (Abb. 1.2.). Dieser Raum wird aus naheliegenden Gründen als Inter-Chromatin-Domänen-Kompartiment (ICD-Kompartiment) bezeichnet und kann durch eine spezielle Methode in lebenden Zellen sichtbar gemacht werden (Bridger *et al.*, 1998). Dabei sieht man ein Netzwerk miteinander verbundener Kanäle, die die Chromosomen-Territorien umgeben und sich in einigen Fällen durch einzelne Territorien hindurch ziehen. Dieses Kanalsystem ist an einigen Stellen so dünn, dass sich individuelle Chromosomen zu berühren scheinen, ohne dass es jedoch an den Kontaktstellen zu einer Vermischung der DNA der beiden Chromosomen kommt. Die traditionelle Modellvorstellung besagt, dass aktive Gene an der Peripherie, und nicht-kodierende Sequenzen der DNA im Zentrum der Chromosomen-Territorien liegen (Kurz *et al.*, 1996; Cremer & Cremer, 2001). Neuere Ergebnisse zeigen, dass Chromosomen-Territorien in gewisser Weise polar aufgebaut sind, wobei inaktive Gene zu meist im kompakten Inneren des Territoriums lokalisiert sind. Aktive Gene liegen dagegen bevorzugt an der Oberfläche der Territorien, und können auf diese Weise die neu synthetisierte RNA direkt in das ICD-Kompartiment abgeben. So lässt sich das ICD-Kompartiment auch dadurch sichtbar machen, dass

man die Orte neuer RNA durch *in-situ*-Hybridisierung anfärbt. Verfolgt man dabei nur die Transkripte eines bestimmten Gens, zeigen sich Spuren von RNA („RNA tracks“, „Transkript-Spuren“), die vom Ort des transkribierten Gens ausgehen und auf möglichst kurzem Weg zur Peripherie des Kerns und den Kernporen führen (Lawrence *et al.*, 1989). Das ICD-Kompartiment scheint somit auch für den Transport von Makromolekülen innerhalb des Zellkerns wichtig zu sein, die nicht frei diffundieren sondern den von den Chromosomenterritorien festgelegten Wegen folgen.

In der Arbeitsgruppe um Denise Sheer, Cambridge UK, konnte erstmals im Bezug auf die dreidimensionale Organisation im Interphase-Zellkern die Lage des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) auf Chromosom 6 visualisiert werden (Volpi *et al.*, 2000). Außerdem ist es nach Induktion gelungen, das Ausloopen der Genregion zur Transkription in das Interchromatin-Kompartiment nachzuweisen. Auch beim Anfärben der IFN-Gendomäne in humanen FS4-Zellen ist es uns gelungen zu zeigen, dass die Region zumeist an der Peripherie des Chromosomen-Territoriums lokalisiert ist (Abb. 2.13). Diese Position ist nicht unerwartet, da das IFN-Gencluser im Bezug auf die Genverteilung des gesamten Genoms in einer R-Bande lokalisiert ist. Aktuelle Gen-Verteilungstabellen zeigen, dass im Interphasekern das Chromatin von R-Banden im Gegensatz zu G-banden genreicher ist und viel weniger kondensiert vorliegt (Yokota *et al.*, 1997) und so dem Transkriptionsapparat in der Interchromatindomäne besser zugänglich ist. Die Interferone gehören zur unspezifischen Immunabwehr und sollten daher bei Induktion schnellstmöglich transkribiert werden. Sie befinden sich im „*potentiated state*“, d.h. sie sind jederzeit transkribierbar, werden jedoch nicht gezwungenermaßen aktiv transkribiert. Unsere Untersuchungen zeigen, dass sie durch ihre Nähe zum Transkriptionsapparat in der Interchromatindomäne optimal zugänglich sind.

2.4. S/MARs als Integrationsort für Viren

Das Potenzial, das in S/MAR Elementen steckt, haben auch gewisse Retroviren entdeckt. Sie nisten sich in ihrer DNA-Zwischenstufe in diese spezifischen Stellen im Genom ein, um ihrer eigene Vermehrung zu verstärken. Da die Viren dabei zelluläre Mechanismen für ihre Vermehrung ausnutzen, besteht in der Suche nach zellulären Interaktionspartnern mit Hochdurchsatzmethoden eine Möglichkeit, Zielmoleküle zu definieren, die bei pathogenen Vertretern zu Therapiezielen angesteuert werden (HIV, SIV) bzw. bei Verwendung der

Retroviren als Genföhren (MLV, Lentivirale Vektoren) zur Verbesserung gewünschter Eigenschaften dienen können.

Dass eine DNA-Integration nach einer retroviralen Infektion vorwiegend an S/MAR-Elementen stattfindet, ist bekannt (Mielke *et al.*, 1996). Die retrovirale Integration ist ein Enzym-katalysierter Prozess, an dem auch das Reparatursystem der Wirtszelle beteiligt ist (Shih *et al.*, 1988). Da dieses Reparatursystem an der Kernmatrix lokalisiert ist (Boulikas, 1995), ist eine provirale DNA-Integration in der Nähe von S/MAR-Elementen nicht unerwartet. Retroviren sind darüber hinaus darauf angewiesen, dass nach dem Einbau eine Expression des Provirus erfolgt (Scherdin *et al.*, 1990). Auch das spricht für S/MAR-Elemente als Integrationsorte nach einer retroviralen Infektion. In dieser Arbeit konnten zum erstenmal durch Halo-Fish-Untersuchungen virale Integrationsorte bei Zellen visualisiert werden. Bei Infektion mit dem SIV-Virus konnte in 20% der infizierten Zellen eine einzelne Integration des Virus nachgewiesen werden, wobei der Integrationsort immer an der Kernmatrix liegt (vgl. Abb.2.14.). Betrachtet man die hier gezeigten Integrationsergebnisse unter einem gentherapeutischen Gesichtspunkt, böte sich vor allem die Sequenzierung der instabilen Integrationsorte an. Dazu könnten Methoden wie die inverse PCR eingesetzt werden (Mielke *et al.*, 1996). Ziel solch einer Sequenzbestimmung ist unter anderem ein besseres Verständnis bezüglich einer stabilen Gentherapie. Heutzutage übliche gentherapeutische Ansätze basieren auf dem retroviralen Gentransfer. Vor einigen Jahren wurden klinische Versuche durchgeführt, um über diese Methode den Immundefekt *severe combined immunodeficiency-X1* (SCID-X1) zu therapieren. Hier zeigte sich, dass die retrovirale Infektion sekundäre Leukämien auslösen kann (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000; Marshall, 2002). Aufgrund dessen wurden die Experimente bis auf weiteres eingestellt. Eine mögliche Erklärung für das Auslösen sekundärer Leukämien könnte die Integration der proviralen DNA in fragile instabile genomische Bereiche sein. Integriert provirale DNA in genomische Bruchpunkte, kann das zu Deregulationen in einer DNA-Domäne führen (Barker *et al.*, 1991, Mielke *et al.*, 2002). Die Integration von Fremd-DNA in instabile Regionen könnte darüber hinaus in Translokationen im Genom resultieren. Die Risiken, sekundäre Erkrankungen über eine stabile Transgen-Integration auszulösen, machen eine bessere Charakterisierung der Transgen-Integrationsorte für eine kalkulierbare Gentherapie dringend erforderlich.

2.5. Ausblick

Von einem allumfassenden Verständnis der Struktur des eukaryotischen Zellkerns und all seinen Abläufen ist man noch weit entfernt. Die Untersuchungsergebnisse der letzten Jahre geben zwar erste wichtige Einblicke in einzelne Teilaspekte, es ist aber noch schwer, architektonische und funktionelle Daten zu einem sinnvollen Ganzen zu vereinen. Mit wachsender Menge an genetischen Informationen rücken neue Aufgaben in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Arbeit. Besondere Bedeutung bei der Auswertung der Sequenzen kommt der Entwicklung neuer Verfahren zur Vorhersage genomischer Funktionen zu. Die Mängel bisheriger Methoden liegen dabei ganz klar in der hohen Fehlerrate. Eine Kombination von Vorhersage codierender und regulatorisch struktureller Bereiche wird zu einer wesentlichen Effektivitätssteigerung bei der Identifizierung funktioneller Sequenzabschnitte führen. S/MARs sind die DNA-Elemente, denen eine Hauptaufgabe bei der Organisation genomischer Domänen zukommt. Die Berechnung ihrer Position wird nicht nur der Bestimmung der Grenzen von Transkriptionseinheiten dienen, sondern wird gleichzeitig wichtige Hinweise auf funktionelle Aspekte der Genexpression liefern. Beispiele für die Bedeutung der S/MARs als Marker für Genfunktionalität sind die Befunde, dass viele Pseudogene über keine funktionellen, in ihrer Sequenz destabilisierten S/MAR-Elemente mehr verfügen. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das SIDD-Profil, mit der ihm zugrunde liegenden Berechnung der Stabilität der DNA-Doppelhelix, in der Lage ist, funktionelle S/MAR-Elemente vorherzusagen. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt und erweitert werden.

Da die Zellkernarchitektur offenbar eng mit den zentralen genetischen Prozessen der Genexpression und DNA-Replikation verknüpft ist, lässt ihre Erforschung wichtige neue Ansatzpunkte zur Beeinflussung dieser Prozesse erwarten. Abgesehen vom reinen Wissenszuwachs wird dies langfristig auch von medizinischem Interesse sein.

4. Material & Methoden

4.1. Geräte

CCD-Kamera	Photometrics CoolSnap
Elektrotransformator	BioRad Gene Pulser II
Fluorometer	Hoefer DyNA Quant 200
Gel-/Bildanalyse	Software Molecular Dynamics Image Quant
Gelelektrophoresekammer	Gibco BRL Horizon 58
	Gibco BRL Horizon 2025
	Gibco BRL Vertical V16
	Mini Protean 3 Cell (Biorad)
Hybridisierungssofen	Robbins Scientific Hybridization Incubator Model 310
Kühlzentrifugen	R412, Juoan
	Sorvall Superspeed RC5-C
	Festwinkelrotoren: GSA, GS3, SS34
	Schwingbecherrotor: HB4
Laborschüttler	Scientific Industries Vortex Genie 2
Mikroskope	Olympus CK 2
	Leitz Labovort
	Zeiss Axiovert TV 135 mit Fluoreszenzvorrichtung
Netzgerät	POWER-PAC 300 (BioRad)
ThermoCycler	Biometra T3 Thermocycler
pH-Meter	Φ 340, Beckmann
Phosphoimager	STORM 680, Molecular Dynamics
Photometer	Eppendorf BioPhotometer
Scintillationszähler	Beckmann LS 6500
Strilbänke (Zellkultur)	Heraeus, HLB 2448
	Heraeus, HSP 18
Taumelschüttler	REAX 3, Heidolph
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436
Tischzentrifugen	Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge fresco
	Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge pico
Ultraschallhomogenisator	Sonopuls HD 2200, Bandelin
UV-Kammer	Hanau
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Milli-Q Water Purification System
Zellkultur-Inkubator	Forma Scientific Water-jacketed Incubator Modell 3336

4.2. Material

4.2.1. Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Amersham, Bayer, Biolabs, BioRad, Boehringer, BRL, Difco, Fluka, Gibco, Hoechst, MBI Fermentas, Merck, Pharmacia, Promega, Qiagen, Roche Pharma, Roth, Serva, Sigma und Stratagene verwendet.

Radioaktive Chemikalien wurden von der Firma Amersham bezogen.

4.2.2. Zellkulturmaterialien

Das Kunststoff-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wurde von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

4.2.3. Zelllinien

FS4	primäre Fibroblastenzelllinie aus menschlichen Vorhautzellen
2 ₄	klonale Linie von mit pCosIFN _γ und pH79 2cos/tk kotransfizierten
NIH/3T3	Embryonale Mausfibroblasten (ATCC No. CRL-1658)
Vero	Nebennieren-Zelllinie vom Affen mit defektem Interferon-Locus (ATCC CCL-81)

4.2.4. Bakterienstämme (*E. coli*)

DH10B:	[F ⁻ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZM15 lacX74 deoR recA1 ara139 (ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL end A1 nupG λ ⁻ tonA]
TOP10:	[F ⁻ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZM15 lacX74 deoR recA1 araD139 (ara, leu)7697 galU galK rpsL(StrR) end A1 nupG]
XL1-Blue:	[recA1 endA1 gyrA96 thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F _{pro} AB, lacIqZM15, Tn10, (tetr)]

4.2.5. Enzyme

Die Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (NEB), Boehringer, BRL, Invitrogen, Merck, Promega und Roche Pharma bezogen.

4.2.6. Plasmidvektoren

Liste der eingesetzten humanen BAC-Klone

Die verwendeten humanen Bac-Klone stammen aus der BAC-Bank RPCI11 und wurden am Roswell Park Cancer Institute in der Gruppe von P. deJong kloniert. Der Bac-Klonierungsvektor heißt *pBACe3.6* (Acc.Nr. U80929).

Klon-Name	Accession-Number	Bemerkung
bA345P17	AL353732	umfasst Gene IFNA1-A13
bA380P16	AL162420	umfasst Gene IFNA2-A17
bA1P8	AL512606	umfasst Gene IFNWP18-IFNB1
bA113D19	AL390882	umfasst Gene IFNW1-IFNB1

Liste der eingesetzten murinen BAC-Klone

Die verwendeten murinen Bac-Klone stammen aus der BAC-Bank RPCI23 und wurden auch am Roswell Park Cancer Institute in der Gruppe von P. deJong im Klonierungsvektor *pTARBAC2.1* kloniert.

Klon-Name	Accession-Numbe	Bemerkung
RPCI23 19G2	AL772316	beinhaltet IFNb
RPCI23 67C1	AL772394	umfasst IFNb bis IFNa13
RPCI23 139P14	AL928605	umfasst IFNa13 bis IFNa11
RPCI23 360M23	BX530016	umfasst IFNz bis IFNa4

Liste der eingesetzten murinen Fosmid-Klone

Die verwendeten murinen Fosmid-Klone stammen aus der *WIBR-1 Mouse Fosmid Library* und wurden am Whitehead Institute/MIT unter Ver-

wendung des "EpiFOS" *fosmid cloning kit* kloniert. Der Klonierungsvektor heißt *pEpiFOS5*.

Klon-Name	Accession-Number	Bemerkung
WI1-2064N16	G135P64620B5	IFNb
WI1-2214J2	G135P603664D12	IFNb
WI1-1563E17	G135P603875B2	IFNa9, IFNa12
WI1-458K8	G135P600908B10	IFNa13
WI1-970N6	G135P67477C9	IFNa 2
WI1-2389F18	G135P600232F4	IFNa11, IFNa6, IFNa4, IFNa7
WI1-1626M21	G135P600947F4	IFNa6, IFNa4, IFNa7

Plasmide

pTZ18R	Klonierungsplasmid, das als Selektionsmarker das Ampicillin-Gen enthält (Pharmacia; Acc.Nr. L08956)
pTZE20	enthält das gesamte <i>Eco</i> RI-Fragment SAR-E 5' des IFN-Gens, einkloniert in die <i>Eco</i> RI-Schnittstelle der <i>Multicloning-Site</i> des Klonierungsvektors pTZ18R (Mielke et al.1990)
pGX10-SIV-GE	enthält Sequenz des SIVgagenv (Dr. You-Suk Suh, DPZ)

4.2.7. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind stets unter ihrem ursprünglichen Synthesenamen in 5'-3'-Orientierung aufgelistet. Alle Oligonukleotide, die für Scaffold-Reassoziationsexperimente designt wurden, enthalten die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Eco* RI „CGGAATTC“.

mIFNb1fw	CGGAATTCATTGTTCTGAGATTTGCATC
mIFNb1rv	CGGAATTCAACCCACATTTTACAAAGCCT
mIFNb1bfw	CGGAATTCTGAAAAGAAAATGGCAGGAGA
mIFNb1brv	CGGAATTCTTCTCTATGTATTTCCCCTGGAAG
mIFNb2fw	CGGAATTCATTTTACTGAGTACTCCACA
mIFNb2rv	CGGAATTCTTACTAGCAGCCACACTTTTG
mIFNb3fw	CGGAATTCTTACATTAAAAACAACCTGGG
mIFNb3rv	CGGAATTCGGCCTAAAATATACTCTTCCC
mIFNb32fw	CGGAATTCAGAAAAGCAGGGCGTTAAAAA
mIFNb33fw	CGGAATTCATAGTTGCAGAAGGGTGCCA
mIFNb4fw	CGGAATTCTAGATACACATACATACACAC
mIFNb4rv	CGGAATTCAATATGTCTGTGTTCTTTCTT
mIFNb5fw	CGGAATTCGCACTGAACAGGTCTAAAAAC
mIFNb5rv	CGGAATTCCTTATCTCATGTTTCCAGTG
mIFNb6fw	CGGAATTCATGTGACTGTGGACAAATTAT
mIFNb6rv	CGGAATTCTTTGCAGATATGGTTAATGAA
mIFNb7fw	CGGAATTCCAGTCATTTCCCTAGATGCTT
mIFNb7rv	CGGAATTCAAGACTTACCAGAACTTCCA
mIFNb72fw	CGGAATTCAACCTGGGGTACCTTCTGCT
mIFNb8fw	CGGAATTCACGCACCCTCAGTCTTGCTT
mIFNb8rv	CGGAATTCGGCCTTCACTTTAACTGGCCT
mIFNb9FW	CGGAATTCGAGTGGACGCCTTGCAAGTGG
mIFNb9RV	CGGAATTCATTCCCTGGGTACCAGCAGTGG
mIFNb11FW	CGGAATTCTTGGCTTCTCTTTCTCTGC
mIFNb11RV	CGGAATTCGTTGTGATCAGAGGCCACCT
mIFNb12FW	CGGAATTCGCACATCATGCTGGCTGTA
mIFNb12RV	CGGAATTCGTCTTCTCAGCCAAGTTGC

mIFNb13FW CGGAATTCTAGAAAGCAATAAACTAAGGG
mIFNb13RV CGGAATTGATAGGTATGAATCTCTTTGTAT
mIFNb14FW CGGAATTCCATTGATCCCATGAGAGCTG
mIFNb14RV CGGAATTCCCTGAACCAAAATGGAGAGG
mIFNb15FW CGGAATTCTCCAAATGCCCTCTCCATAC
mIFNb15RV CGGAATTCCTGATGAGGGCTCCTGAGTT
mIFNb16FW CGGAATTCCTGAATGCTCCCCCTTACTTCCCA
mIFNb16RV CGGAATTCTGGACACCAACCCTCCAGGCTTG
mIFNb17FW CGGAATTCCCATGTTTACAGTGGCCTTA
mIFNb17RV CGGAATTCTTTCACCTCCCAGGTCTCTG
mIFNb18FW CGGAATTCCCATTTTTGTCCCTGCAGTT
mIFNb18RV CGGAATTCTGCATAGCCTGCAATGTTGT
mIFNb19FW CGGAATTGCTGAGTCATGAAGTTTTTGC
mIFNb19RV CGGAATTCCCTTCTGCTGGAAGCCTATG
mIFNb20FW CGGAATTCCAAGGAATATGACAGGAGCAAG
mIFNb20RV CGGAATTCGGAGGTGGTCAGAGCAGAAG
mIFNb21FW CGGAATTCTGAAGGAATGCCAGGACAGG
mIFNb21RV CGGAATTCGGGAAGTGGTCAGAGCAGAA
mIFNb22FW CGGAATTCGGCTCAGGCTACTCCTGACT
mIFNb22RV CGGAATTCGCATCCTCCTGTCTCCATCT
mIFNa23fw CGGAATTCAGGCTTGAGTCCTGAGACCA
mIFNa23rv CGGAATTCGCGAATATTTGGTCAAAGTGG
mIFNa24fw CGGAATTCGCATTATAAGACACTTGGGATTG
mIFNa24rv CGGAATTCGATTAGTGGTGTTCAGAGGGTTA
mIFNa25fw CGGAATTCGGAGGTGGTCAGAGCAGAAG
mIFNa25rv CGGAATTCTCCGAGGAACACTACATGC
mIFNa26fw CGGAATTCCTGGAGAGCCCTCTCTTCT
mIFNa26rv CGGAATTCAGAGGCAGGTGGATTTCTGA
mIFNa27fw CGGAATTCTGTGGGTTCACACTCAGCTC
mIFNa27rv CGGAATTCTTCTGAATGCCCTTCCATC
mIFNa28fw CGGAATTCGGAGGTGGTCAGAGCAGAAG
mIFNa28rv CGGAATTCTGTGTTGTCTGGGCATTCAGA
Mus-P-loc-fw CGGAATTCTGAATGCTGTGCAGTGTAC
Mus-P-loc-rv CGGAATTCCAGCCTAGATGTTCCAGCAA
Mus-T-loc-fw CGGAATTCGGTAAACATTGTTTGTCTGA
Mus-T-loc-rv CGGAATTCACCATTTTATATATTGGGCC
Mus-Int-1-fw CGGAATTCAATAGAGTTGTCATTGACCA
Mus-Int-1-rv CGGAATTCATTTTACCCAGTGAGCTCTC
Mus-Int-2-fw CGGAATTCTCATGGGTGGCGGATTAA
Mus-Int-2-rv CGGAATTCCTCCTTTGTCAAATATCAA
Mus-Int-3-fw CGGAATTCAGAGGCTCATTGGACTTGCA
Mus-Int-3-rv CGGAATTCTGCTTGTACCAGCTTGCAAT
Mus-Int-32-rv CGGAATTCCAAGAGATTTGAAATATGTACA
Mus-T-A14-fw CGGAATTCTTTTACCATCAGTGAAAGAG
Mus-T-A14-rv CGGAATTCATTCTGGCAATAATTCAAGC
Mus-P-A14-fw CGGAATTCTTATCTCTGATAAACTCCCA
Mus-P-A14-rv CGGAATTCCAGGTCATCAAACCTTGACTA
Mus-Int-4-fw CGGAATTCTGTCTCTAGCTGCATATGAA
Mus-Int-4-rv CGGAATTCTGGACTAGAACACTGCATCT
Mus-Int-5-fw CGGAATTCATCAGGGTCTACTATAAAGCT
Mus-Int-5-rv CGGAATTCCAGGTGTCAATAAGTGTATATG
Mus-Int-6-fw CGGAATTCTTGGTGTGTGGCAGAGCTAA
Mus-Int-6-rv CGGAATTCTTTCAGATCGGGTGTTAAGA
Mus-T-A9-fw CGGAATTCACAATGTGTGATGCTAAGTG

Mus-T-A9-rv CGGAATTCGCATGAATTGAAAGAAGTTG
 Mus-P-A9-fw CGGAATTCGGTCTGGGTATTTTCTAAACCATT
 Mus-P-A9-rv CGGAATTCGTAAGTGGGTCCAGGAAT
 mIFNp2FW CGGAATTCAGGTGCTCTACCAGTGCTTGAT
 mIFNp2RV CGGAATTCCTATTCTCTTTCCCGGAGGTCT
 Pan-WP18-1fw CGGAATTCTGACTGTATCAACAATAATC
 Pan-WP18-1rv CGGAATTCAGCCGGTTTATATAAGGTAG
 Pan-WP18-2fw CGGAATTCACAAACAAAAGGTAGAGCCA
 Pan-WP18-2rv CGGAATTCATATTCCGTAAAGGTTTTTC
 Pan-P-A10fw CGGAATTCTTATGTCAAGTGCTGAAAAG
 Pan-P-A10rv CGGAATTCGTATACCTCTACTTCACAGAT
 Pan-T-A10fw CGGAATTCATGTTTTTCAGCAGCGTGAAG
 Pan-T-A10rv CGGAATTCAGATACAAGAGAACAGGGAC
 Pan-int1fw CGGAATTCGGGAAGTAATAAGTTGGTAC
 Pan-int1rv CGGAATTCTTAAATAAGGAATCCCTTCC
 Pan-int2fw CGGAATTCAGAGAGAAAGTTGGTCAAAA
 Pan-int2rv CGGAATTCTCCTCTGACAGGTATTTATAC
 Pan-int3fw CGGAATTCTCATCATTAGCCTGCACTGC
 Pan-int3rv CGGAATTCGCTGCTGTCTTGGTGCCTT
 Pan-int4fw CGGAATTCAGCTCCTCTCTCCTTTGAT
 Pan-int4rv CGGAATTCAGCCAGAACCAAGTCAAT
 Pan-int42rv CGGAATTCTGACCACTGCACCTAAGAGT

4.2.8. Antikörper (Primär)

Ziege anti-CTCF; SantaCruz

Ziege anti-LaminB; SantaCruz

4.2.9. Computerprogramme

Die Auswertung von Autoradiographien wurde mit *Image Quant Version 5.0* von Molecular Dynamics durchgeführt. Die Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen, das heißt Sequenzanalysen und Restriktionskartierungen sowie die Verwaltung von Oligonukleotiden, erfolgte mittels *VectorNTI 5.0* und *7.0*.

4.3. Allgemeine Grundtechniken

(nach Shamrook et al., 1989)

4.3.1. Sterilisieren

Glasgeräte werden vor Gebrauch 4 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert. Alle Lösungen werden entweder sterilfiltriert (0,22 µm Filter) oder autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 1 bar).

4.3.2. Fällern von Nukleinsäuren

Zur Fällung von DNA versetzt man eine Nukleinsäure-Lösung mit einem einfach geladenen Salz und Alkohol. Als Salz wird eine 3 M NaAcetat-Lösung mit pH 5 im Verhältnis 0,1 Volumen der DNA-Lösung verwendet, und als Alkohol dienen 2 Volumen 100% EtOH. Die Nukleinsäure fällt nach dem Mischen der Lösung aus. Nach einer Inkubation von 0,5 - 2h bei RT erfolgt eine Zentrifugation für 5 bis 30 min mit 13.000 UpM bei 4°C. Das Pellet wird zweimal mit

70% Ethanol zum Aussalzen gewaschen, 10 Min getrocknet und in 1x TE gelöst.

4.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD) bei der Wellenlänge von 260 nm. Eine verdünnte Nukleinsäurelösung wird in einer Küvette mit UV-Licht angeregt, und die Extinktion wird gemessen. Die Konzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA und RNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Aus dem Verhältnis der $OD_{260\text{ nm}}$ und der $OD_{280\text{ nm}}$ erhält man außerdem eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung.

4.4. Methoden zur DNA-Präparation

4.4.1. Präparation von Plasmid-DNA – Minipräparation

Die *boiling method* zur Gewinnung von DNA aus Bakterienkulturen nach Holmes und Quigley ist einfach und schnell und liefert „schmutzige“ DNA mit viel bakterieller DNA und Proteinen.

STET-Puffer:	8%	Sucrose
	0,5%	Triton X-100
	50 mM	EDTA
	10 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	steril filtrieren, Lagerung bei 4°C	
LTE-Lösung:	10 mg Lysozym / 1 ml TE	
	Lagerung bei -20°C	
TER-Lösung:	10 µg RNase A / 1 ml TE	

Das Pellet von 2 ml LB-Bakterienkultur mit entsprechendem Antibiotikum wird in 500 µl STET-Puffer resuspendiert, 50 µl LTE (10 mg/ml) zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschliessend stellt man die Probe 90 sek bei 95°C in einen Eppendorf Thermomixer und zentrifugiert dann für 5 min bei 13.000 UpM. Es entsteht ein zähflüssiges Pellet, welches mit einem autoklavierten Zahnstocher entfernt werden kann. Nach der Zugabe von 50 µl 7,5 M NH_4Ac und 500 µl Isopropanol wird die Probe gemischt und die DNA für 5 min bei 13.000 UpM pelletiert. Anschliessend wird das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und nach kurzem Trocknen wird die DNA in 100 µl TER-Lösung (RNase A 10 µg/ml) aufgenommen.

4.4.2. Präparation von Plasmid-DNA – Maxipräparation

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Ausbeute von etwa 500 µg Plasmid-DNA) wird das Präparations-Kit der Firma Qiagen, Hilden verwendet.

Puffer P1 (Resuspensionspuffer):	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysispuffer):	200 mM NaOH, 1% SDS
Puffer P3 (Renaturierungspuffer):	3 M NH_4OAc
Puffer QBT (Äquillibrierungspuffer):	70 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% EtOH, 0,15% Triton X-100

Puffer QC (Waschpuffer):	1,0 NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% EtOH
Puffer QF (Elutionspuffer):	1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 50% EtOH
Qiagen-Säulen:	100 (Midi-Präparation) 500 (Maxi-Präparation)

Die zu präparierenden Bakterienklone werden in 200 ml LB-Medium in einer Schüttelkultur bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (10 min, 5000 UpM) werden die Kulturen nach den Angaben des Herstellers Qiagen, Hilden aufgearbeitet. Hierfür wird das Bakterienlysat per Zentrifugation geklärt und auf eine Qiagen-Säule gegeben. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt bei dieser Methode durch die Bindung der DNA an eine Anionenaustauscher-Säule basierend auf SiO₂ unter definierten Salz- und pH-Bedingungen. Nach dem Entfernen von Verunreinigungen durch Waschschriffe wird die DNA mit Hilfe eines Hochsalzpuffers von der Säule eluiert, mit Isopropanol präzipitiert und mit 70% EtOH entsalzt.

4.4.3. Präparation von Cosmid- und BAC-DNA

Zur Aufreinigung von Cosmid- und BAC-DNA wird das DNA-Isolations-Kit der Firma Princeton Separations verwendet. Im Kit sind folgende Komponenten enthalten:

Resuspensionspuffer, Lysepuffer, Neutralisationspuffer, BAC DNA Bindungslösung, Waschpuffer, Eluierungspuffer, RNase A, Säulen

Nach Herstellerprotokoll wird die BAC DNA aus 50 ml LB-Kulturen (12,5 µg/ml Chloramphenicol) isoliert; man gewinnt 5 bis 7 µg DNA pro Präparation.

4.4.4. Präparation von genomischer DNA (HMW)

Quick-DNA (nach Ramirez-Solis et al., 1995)

Modified Bradleys-Lösung: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% SDS, 1 mg/ml Proteinase K

Konfluent gewachsene Zellen einer 9,1 cm² Kulturplatte werden mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml *Modified Bradleys-Lösung* versetzt. Nach Überführen der Lösung in 1,5 ml Eppendorfgefäße werden die Proben über Nacht bei 55°C inkubiert. Die DNA wird am folgenden Tag durch die Zugabe von 1 ml 75mM NaAc in 100% EtOH ohne Schütteln 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach vorsichtigem Schwenken und Zentrifugieren (5 min, 1800 UpM) bei Raumtemperatur wird die DNA pelletiert. Danach erfolgen 2 Waschschriffe mit je 1 ml 70% EtOH und nach kurzem Trocknen wird die DNA in 30 bis 100 µl TE aufgenommen. Zur vollständigen Resuspendierung schüttelt man die DNA-Lösung noch einige Zeit bei 37°C in einem Thermomixer, bevor die Konzentrationsbestimmung am Photometer erfolgt.

4.4.5. DNA-Rückgewinnung aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen erfolgt mittels *QIAquick*, einem Gel Extraktions-Kit der Firma Qiagen, Hilden.

Puffer QG

Puffer PE

Puffer EB (Elutionspuffer)

QIAquick-Zentrifugations-Säulen

Das Prinzip der Gel Extraktion beruht auf der DNA-Bindung an eine Silica-Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffern, während Verunreinigungen aus der Säule ausgewaschen werden. Die zu isolierende DNA-Bande wird aus einem Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen aufgereinigt. Anschließend wird die gereinigte DNA mit Puffer EB, TE oder H₂O eluiert.

4.4.6. Gewinnung von Kompetitor-DNA aus *E.coli*

200 ml LB-Medium werden mit *E.coli* (Stamm DH10b) angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden pelletiert und mit 20 ml Proteinase K-Lösung (0,1 mg/ml) versetzt. Nach mindestens zweistündiger Inkubation bei 56°C sollte die Suspension relativ klar sein und kann mit 40 ml EtOH/LiCl versetzt werden. Die präzipitierte DNA wird mittels eines Glasstabes aufgespult und mit 20 ml 70% EtOH gewaschen. Anschließend wird die DNA in 20 ml TE bei Raumtemperatur gelöst und in einem Ultraschallgerät sonifiziert (Einstellungen: 0,7 s Intervall, 86 Watt, ca.5 Minuten). Um Restproteine zu entfernen, wird die DNA-Lösung einmal mit 1 Vol Phenol und zweimal mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gewaschen. Die wässrige Lösung wird mehrfach gegen 1x TE bei Raumtemperatur, und schließlich bei 4°C über Nacht dialysiert. Am Folgetag wird die DNA-Konzentration gemessen (Konzentration: ca. 1 µg/µl) und die Fragmentgröße auf einem Agarosegel überprüft. Die optimale Fragmentgröße für Kompetitor-DNA liegt zwischen 200 und 2000 bp.

4.5. Modifikation und Analyse von Nukleinsäuren

4.5.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Für die enzymatische Spaltung von Plasmiden oder PCR-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen werden die von den Herstellern der einzelnen Enzyme angegebenen Reaktionsbedingungen angewendet. Die Restriktionspuffer werden als 10fach konzentrierte Stammlösungen bei 4°C gelagert. Die DNA (in einer Konzentration von bis zu 1 µg/µl) wird in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei der angegebenen Temperatur (zumeist 37°C) gespalten. Zur Spaltung der DNA wird die 1-4fache Menge an Enzymeinheiten (Units) eingesetzt. Die Zugabe des Enzyms sollte 10 % des gesamten Volumens nicht überschreiten, da ansonsten Sternaktivitäten auftreten können. Die gespaltenen DNA-Fragmente können im Folgenden für Klonierungen, Transfektionen oder radioaktive Markierungen eingesetzt werden.

4.5.2. Auffüllen von 5'-überstehenden Enden

10x *Klenow*-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 2 mM DTT

dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 3 mM in Wasser

Für Klonierungszwecke kann es notwendig werden, die durch die Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme entstandenen 5' kohäsiven Enden mit Hilfe des *Klenow*-Enzyms aufzufüllen um glatte Enden zu erzeugen. Zudem wird diese *Klenow*-Auffüllreaktion zur radioaktiven Markierung von Plasmid-DNA verwendet. In einem Reaktionsansatz von 30 µl werden bis zu 1 µg gesplattene DNA mit 4 µl Nukleotid-Mix und 1-2 U des *Klenow*-Enzyms in 1x *Klenow*-Puffer bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Es erfolgt eine Hitzeinhibierung des Enzyms bei 65°C für 10 Minuten, und die DNA wird über Sephadex G-50 Säulen (GR Healthcare, GB) nach Herstellerprotokoll gereinigt.

4.5.3. Dephosphorylierung

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

10 x Phosphatase-Puffer: 500 mM Tris/HCl (pH 9); 10 mM MgCl₂; 1 mM ZnCl₂; 1 mM Spermidin

Um bei einer Ligation eine Autoligation des verwendeten Klonierungsvektors zu verhindern, werden die entsprechenden 5'- oder 3'-Enden zuvor mit alkalischer Phosphatase (*calf intestine phosphatase*; CIP) dephosphoryliert.

In einem Reaktionsansatz von 20 µl Endvolumen werden 2 µl 10 x Phosphatase-Puffer und 2-10 pmol überstehende Enden mit 1 U Phosphatase 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 U Enzym wird für weitere 30 min inkubiert und die Reaktion anschließend durch Hitzeinaktivierung gestoppt (10 min bei 65 °C).

4.5.4. T4-Kinase-Reaktion

10x Polynukleotid-Kinase-Puffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7,6), 0,1 M MgCl₂, 10 mM EDTA; 50 mM DTT

Die T4-Kinase phosphoryliert Nukleinsäuren an der freien 5'-OH-Gruppe der Desoxyribose. Diese Reaktion kann zur radioaktiven Markierung benutzt werden und ist Voraussetzung für die Oligomerisierung von PCR Fragmenten bei nicht phosphorylierten Primern.

1-40 pmol dephosphorylierte DNA werden mit 1 µl 10x Kinasepuffer, 3,3 µl 3 mM ATP und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U) versetzt. Die Reaktion wird in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wird die Reaktion durch eine 5-minütige Inkubation bei 65°C abgestoppt. Anschließend können nicht inkorporierte Nukleotide und Salze über MicroSpin G-50 Säulen (Amersham) vom Phosphorylierungsansatz getrennt werden.

4.5.5. Ligation von DNA-Fragmenten

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

10 x Ligase-Puffer: 250 mM Tris/HCl, pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 5 mM ATP, 25 µg/ml BSA

Bei der Ligation verknüpft die T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente, die sowohl kompatible, überstehende, als auch glatte Enden besitzen. Dabei erfolgt eine Phosphodiester-Bindung zwischen den 3'-OH- und den 5'-Phosphatenden der DNA. Für die Ligation überstehender, kompatibler Enden werden in einem 10 µl Ansatz 0.1-0.2 pmol eines gegebenenfalls zuvor dephosphorylierten Vektors mit 0.2-0.4 pmol eines DNA-Fragments, 1 µl 10 x Ligase-Puffer und 400-2000 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, FfM) eingesetzt. Der Ligationsansatz wird bei 16°C für mindestens 2 Stunden oder über Nacht inkubiert. Überstehende, komplementäre Enden werden relativ schnell und vollständig verknüpft, glatte 3'- und 5'-Enden erfordern eine höhere Enzymkonzentration.

4.6. Gelelektrophorese

4.6.1. Agarosegele

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Laufpuffer (TAE): 40 mM Tris/Acetat, pH 7,5, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA
Färbelösung: 5 mg/ml Ethidiumbromid in H₂O
6 x Ladepuffer: a) 25 % Ficoll (w/v), einige mg *Orange G*-Indikator
b) 15 % Ficoll (w/v), 10 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode um DNA-Fragmente von 0,5-25 kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren. Für ein 1%iges Gel wird 1 g Agarose in 100 ml kochendem TAE-Puffer gelöst und mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (5 mg/ml) versetzt. Nach dem Erstarren der Agarose wird das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gesetzt. Die Proben werden mit dem 5-fach konzentrierten Probenpuffer gemischt und in die Taschen des Gels geladen. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wird neben den Proben ein Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei ca. 100 V und 30 mA. Anschließend können die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht (360 nm) betrachtet werden.

4.6.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Standardrezeptur für 3-4 10 %ige Gele (8 cm x 6 cm):

Trenngel: 4 ml H₂O
2,5 ml Trenngelpuffer (1.5 M Tris/HCl, pH 8,8)
3,3 ml Polyacrylamid (Roth, Karlsruhe; 30 %)
100 µl 10 % SDS
40 µl 10 % APS
10 µl TEMED
Sammelgel: 2,25 ml H₂O
0,95 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8)
0,45 ml Polyacrylamid (30 %)
38 µl 10 % SDS
15 µl 10 % APS
8 µl TEMED
8x Probenpuffer: 0,25 M Tris/HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% Glycerin, 20% β-Mercaptoethanol

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel. Das Natrium-Dodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine und führt durch seine stark negative Ladung dazu, dass die Proteine negativ geladen vorliegen und deren Eigenladung zu vernachlässigen ist.

Die Proteine werden mit Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen für 10 min bei 95°C aufgeköcht, um höhere Strukturen aufzubrechen. Zelltrümmer und andere Aggregate werden mittels Zentrifugation bei 13.000 UpM für 5 min entfernt bevor die Proben auf das Gel geladen werden. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 30-40 mA in 1x Elektrophoresepuffer (3 g Tris/Base, 14,4 g Glycin, 1 g SDS auf 100 ml H₂O) durchgeführt.

Zur permanenten Aufbewahrung werden die Gele 1 bis 2 h in Trocknerlösung (50% Methanol (v/v), 3% Glycerin (v/v)) inkubiert und anschließend in einen Rahmen zwischen Zellophanfolien (BioRad, München) gespannt und getrocknet.

4.7. Polymerase Ketten Reaktion (RCR)

7.7.1. Standard-PCR

(Saiki *et al.*, 1988)

Die Polymerase Ketten Reaktion ist eine einfache aber effiziente Methode zur Vermehrung eines bestimmten DNA-Fragments *in vitro* aus einem Gemisch unterschiedlichster DNasequenzen (z.B. Plasmide, genomische DNA, cDNA-Präparationen). Die Ranfrequenz des Segments müssen zum Design geeigneter Oligonukleotidprimer bekannt sein. Ein PCR-Zyklus besteht aus einer Reihe von aufeinanderfolgenden Inkubationsschritten bei unterschiedlichen Temperaturen: die doppel-strängige DNA wird zunächst bei einer hohen Temperatur denaturiert. Danach erfolgt bei einer niedrigen Temperatur die Bindung der Primer, die komplementär zu den jeweiligen 3'-Grenzen des Zielsegments sind. Diese werden anschließend durch eine DNA-Polymerase bei einer intermediären Temperatur verlängert. Die Verwendung von thermostabilen Polymerasen erlaubt die häufige Wiederholung dieses Zyklus ohne erneute Zugabe des Enzyms. In den meisten Fällen verwendet man die sogenannte Taq-Polymerase von *Thermophilus aquaticus*. Es gibt allerdings noch eine Reihe anderer möglicher Enzyme, die bei speziellen Anforderungen zum Einsatz kommen. So verwendet man zusätzlich Polymerasen mit *proof reading* Aktivität, wenn die Fehlerquote in der Sequenz des Amplifikats möglichst niedrig sein soll. Ein solches Korrekturleseenzym überprüft die von der Taq-Polymerase synthetisierten Sequenzen und eingebaute Fehler werden verbessert, wodurch die Fehlerhäufigkeit auf 1/10 verringert wird. Mit einem solchen System können PCR-Produkte aus genomischer DNA bis zu einer Größe von 15 kb amplifiziert werden. Die Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* wird als Korrekturleseenzym im Expand™ Long Template PCR Kits (Roche Pharma, Mannheim) eingesetzt.

Da während der PCR theoretisch bei jedem Zyklus die betreffende DNA-Sequenz verdoppelt wird, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg ihrer Konzentration, so dass am Ende eine bis zu 109-fache Vermehrung des gewünschten Fragments erreicht werden kann. Ein typischer Reaktionsansatz wird in speziellen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen folgendermaßen zusammengestellt:

2,5 µl	10x PCR-Puffer (13-22 mM MgCl ₂ , 500 mM Tris/HCl, pH 9,2 (25°C), 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄)
2 µl	NTP-Mix, je 5 mM aller vier Nukleotide (100 mM Stammlösungen)
1,5 µl	Primer A 15 pmol, Stammlösungen mit 100 pmol
1,5 µl	Primer B 15 pmol, Stammlösungen mit 100 pmol
0,5 µl	Poymerase-Enzym
17 µl	H ₂ O Millipore-Qualität

Die Gefäße werden in den PCR-Heizblock überführt. Ein Überschichten der Reaktionsvorlage mit Mineralöl ist nicht nötig, da die verwendete PCR-Maschine eine Deckelheizung besitzt.

Ein typisches Temperaturprofil beginnt zunächst mit einem initialen DNA-Denaturierungsschritt (5 min, 94°C). Dieser Schritt sollte nie ausgelassen werden, da die Anwesenheit der Polymerase bei niedrigeren Temperaturen bereits zu einer Verlängerung von fehlhybridisierenden Primern führt, die dann bei den folgenden Amplifikationszyklen als korrekte Templates benutzt werden und zu falschen Produkten führen. Nun schließen sich die Temperaturzyklen an, die typischerweise 20 bis 35 mal wiederholt werden:

Denaturierung:	94°C, 30 s
<i>Annealing</i> :	50°C – 66°C, 30 s (je nach Schmelztemperatur der Primer)
Elongation:	68°C o. 72°C, 120 - 300 s (je nach Enzym und Länge des Templates)

Eine erfolgreiche Versuchsdurchführung von vielen Parametern abhängig und häufig bedarf einer auf die jeweilige Anwendung bezogenen Optimierung:

Da sich die PCR-Methode zum Nachweis extrem geringer Konzentrationen spezifischer Sequenzen eignet, ist sie sehr anfällig gegen Kontaminationen mit anderen Nukleinsäuren. Es muss daher auf möglichst langsames, aerosolfreies Pipettieren geachtet werden.

Die angegebenen Konzentrationen sollten genau eingehalten werden. Um Pipettierfehler zu minimieren, empfiehlt es sich zunächst eine Reaktionsstammlösung anzusetzen und diese dann auf die einzelnen Proben zu verteilen. Die optimale Magnesiumkonzentration muss für jedes Primerpaar empirisch ermittelt werden. Ein Über- oder Unterschuss kann die Amplifikationseffizienz reduzieren oder zu unspezifischen Produkten führen. Der Nukleotid-Mix sollte nur aus vorneutralisierten Stammlösungen zusammengestellt werden. Die einzelsträngigen Oligonukleotidprimer sollten 15 bis 30 bp lang sein und besonders an ihrem 3' -Ende keine Komplementarität zu sich selbst oder zueinander aufweisen. Für eine maximale Spezifität sollte der GC-Gehalt bei etwa 50 % liegen. Die Konzentration an Primern kann variieren, beide Primer sollten aber im äquimolaren Verhältnis vorliegen. Dasselbe gilt für das Verhältnis der vier Nukleotide zueinander.

Die Dauer der einzelnen Schritte der Temperaturzyklen kann leicht verändert werden. Die Laufzeit des Elongationsschrittes richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Man geht etwa von 1000 bp pro min Synthesegeschwindigkeit aus. In vielen Fällen schließt man den Temperaturzyklen noch einen weiteren Elongationsschritt ca. 10 min bei 68°C bzw. 72°C an, um ein Fertigstellen noch nicht beendeter Sequenzen zu gewährleisten.

7.7.2. Sequenzier-PCR

Sequenzierungen werden vom Sequenzierdienst der Arbeitsgruppe Genomanalyse (GNA, Leiter Helmut Blöcker, GBF Braunschweig) durchgeführt.

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgt nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Hierbei werden zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden fluoreszenz-markierte 2', 3'-Didesoxynukleotide eingesetzt, die aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe keine weitere Phosphodiesterbindung ausbilden können und somit zu einem vorzeitigem Kettenabbruch führen.

7.7.3. *Real-time* Quantitative PCR

Die Reverse Transkription von RNA, gefolgt von einer Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR), ist eine extrem sensitive Methode, um spezifische mRNAs zu detektieren und zu quantifizieren. Aus Zellen isolierte RNA wird im ersten Schritt als *Template* für die Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) mittels AMV-Reverse-Transkriptase (Avian Myeloblastosis Virus) eingesetzt. Die cDNA wird wiederum als Template für die folgende PCR verwendet, die entweder mit spezifischen Primern arbeitet, um eine bestimmte cDNA-Region zu amplifizieren, oder aber mit *Random*-Primern, um alle cDNAs zu vervielfältigen.

Um bessere quantitative Aussagen über eingesetzte mRNA Mengen machen zu können, kommen *Real-Time* RCR-Maschinen wie der *LightCycler* von Roche zum Einsatz. Über eine Fluorimeter-Komponente erfasst der *LightCycler* die Bindung von Fluorophoren wie *SYBR Green* an doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenz von *SYBR Green* wird verstärkt, wenn das Molekül an die kleine Furche der DNA bindet. Diese Bindung erfolgt sequenzunabhängig.

Bei dem *LightCycler* RNA Amplifikationssystem *SYBR Green I* von Roche handelt es sich um ein 1-Schritt System mit Reverser Transkriptase und Taq-Polymerase als Enzymgemisch. Ein typischer Ansatz mit diesem System sieht folgendermaßen aus:

8 µl H₂O
4 µl Reaction Mix SYBR Green I
2 µl Resolution Solution
1,6 µl MgCl₂ (4 mM)
2 µl Primer Mix (0,5 mM)
0,4 µl Enzym Mix
2 µl Gesamt-RNA (1 pg- 1 µg)

Nach einem 20minütigen RT-Schritt bei 55°C wird eine PCR mit herkömmlichem Temperaturmuster durchgeführt:

Denaturierung: 95°C, 5 s
Annealing: 55°C – 65°C, 5 s
Elongation: 72°C, 25 s (Produktlänge [bp]/25)

Die Produktbildung wird nach jedem Replikationszyklus über den Fluoreszenzanstieg bestimmt. Nach etwa 50 Replikationszyklen werden die Schmelzkurven der gebildeten Produkte erfasst, um so die Spezifität der PCR-Reaktion überprüfen. Aufgrund des Schmelzverhaltens von DNA nimmt die Fluoreszenz mit steigender Temperatur ab. Die maximale Fluoreszenzände-

rung pro Temperaturerhöhung ergibt ein Maximum in der Schmelzkurve, welches charakteristisch für jedes PCR-Produkt ist.

4.8. Blotten

4.8.1. Southern Blotting

2 bis 10 µg aufgereinigter, hochmolekularer DNA werden mit 2 µl des jeweiligen 10fachen Restriktionspuffers, 0,5 µl TE/RNase (10µg/ml) sowie 20 U des Restriktionsenzym versetzt und über Nacht im Gesamtvolumen von 20 µl bei spezifischer Enzymtemperatur inkubiert. Die verdaut DNA wird mit 5 µl Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 1-2%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt; als Größenstandard wird [35S]-markierte Lambda-DNA verwendet.

Der Transfer der DNA vom Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membrane, Fa. Pall, Dreieich) erfolgt mit 0,4 M NaOH. Das Gel wird mit 0,4 M NaOH neutralisiert und auf eine Blotapparatur überführt: das Gel liegt mit der Unterseite nach oben oberhalb des Flüssigkeitsspiegels auf einem feuchten, exakt auf Gelbreite zugeschnittenen Filterpapierstreifen (Whatman 3MM), dessen gegenüberliegende Ränder in das Pufferreservoir (0,4 M NaOH) eintauchen. Unter dem Filterpapier sollten mehrere Lagen Filterpapier liegen, die nicht mit der Flüssigkeit in Berührung stehen. Auf das Gel wird die Nylonfolie gelegt, die zuvor in NaOH gewässert wurde. Luftblasen zwischen Gel und Membran sind sorgfältig zu entfernen. Auf die Membran werden zwei Lagen mit 0,4 N NaOH angefeuchtetes und 5 Lagen trockenes Filterpapier geschichtet. Nach oben schließt ein Stapel saugfähiges Papier (z.B. *Tork*) die Anordnung ab. Die Apparatur wird vorsichtig mit einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert. Der Transfer sollte mindestens 6 Stunden, meist jedoch über Nacht erfolgen. Anschließend wird die Nylonfolie in 2x SSC neutralisiert und 30 min bei 65°C gebacken. Nach dem Backen kann die Membran zur Hybridisierung eingesetzt werden.

Hybridisierung und Waschen

Hybridisierungslösung:	0,5M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2, 7% SDS, 2 mM EDTA
Waschlösung I:	40mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2, 1% SDS, 2 mM EDTA
Waschlösung II:	40mM NaH ₂ PO ₄ , 0,1% SDS, 2 mM EDTA
Waschlösung III:	100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2, 2 mM EDTA

6 ml der Hybridisierungslösung (nach Church et al. 1989) werden in ein Glasröhrchen gefüllt und die Membran mit der DNA-freien Seite an die Glaswand eingelegt. Die Prähybridisierung erfolgt bei 68°C im Hybridisierungsofen für ca. 30 Minuten. Die denaturierte, radioaktiv markierte Sonde wird hinzugefügt und die Hybridisierung erfolgt bei gleichen Bedingungen über Nacht. Die Oberfläche der Membran darf nicht beschädigt werden und es sollten sich zwischen Membranrückseite und Glaswand keine Luftblasen befinden.

4.8.2. Western Blotting

Beim *Western Blot* erfolgt ein Transfer der durch SDS-PAGE aufgetrennten Zellextrakte (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton, 0,5% Nonidet p-40 (Sigma), 100x Protease Inhibitor Cocktail SetI (Calbiochem)) auf eine Nitrocellulosemembran, um sie dort zu immunologisch identifizieren zu können (Towbin et al., 1979)

Blotpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 15% Methanol

TBS-T: 20 mM Tris/HCL (pH7,4), 140 mM NaCl, 0,1% Tween 20

Nach der Elektrophorese (4.6.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)) wird das Gel zunächst 15-20 min in Blotpuffer geschwenkt. Eine Hybond-ECL-Nitrocellulose-Membran (Amersham) wird mit Wasser befeuchtet und zusammen mit 2 Whatman-3MM-Filterpapieren in der Größe des Gels 10 min in Blotpuffer äquilibriert. In der Tank-Blot-Apparatur erfolgt der Transfer der Proteine über Nacht bei 4°C bei 10 V.

Für den immunologischen Nachweis von den an der Nitrocellulose-Membran gebundenen Proteinen wird die Membran 15 min mit TBS-T und 1 h in Milchpulverlösung abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:10000) erfolgt bei Raumtemperatur für 1,5 h. Es folgt ein dreimaliges Waschen des Blots für 10 min mit TBS-T. Die Inkubation des sekundären Antikörpers, der 1:10000 verdünnt wird, erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur. Erneut wird der Blot 3x für 15 min mit TBS-T gewaschen. Die Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Membran werden mit Hilfe der *Enhanced Chemilumineszenz* (ECL, Amersham) nachgewiesen. Hierzu wird 1 Vol Detektionslösung¹ mit 1 Vol Detektionslösung² vermischt und anschließend mit der Membran bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wird die Membran mit einem Blaulichtsensitiven Autoradiographiefilm für 1 bis 10 min inkubiert.

4.9. RNA

4.9.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

TEN-Puffer: 40 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

Trizol-Reagenz: Ttotal RNA Isolation Reagent, Invitrogen, Karlsruhe

I) Trizol-Isolation

Mindestens 1×10^6 Zellen werden trypsiniert und zweimal mit PBS gewaschen und in TEN-Puffer geerntet. Nach einem Zentrifugations-schritt (5 min, 1000 UpM) kann das Zellpellet bei -70°C gelagert, oder direkt weiterverarbeitet werden. Das Pellet wird in 1 ml TRIZOL (Invitrogen) resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine 30 minütige Zentrifugation (13.000 UpM, 4°C) bevor die RNA zweimal phenolisiert wird. Für die Präzipitation der RNA wird die wässrige Phase mit Isopropanol versetzt. Anschließend wird die RNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, bevor das RNA-Pellet in RNase freiem H₂O resuspendiert und bei -70°C bis zur Analyse gelagert wird.

II) Rneasy Mini Kit, Qiagen, Hilden

Mit Hilfe des Rneasy Mini Kit, Qiagen, ist es möglich die Gesamt-RNA aus wenig Aufgangsmaterial zu isolieren. Konfluent gewachsenen Säugerzellen einer 9,1 cm² Kulturplatte werden mit PBS gewaschen und nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen homogenisiert, lysiert und über eine Säule der RNA-Extraktion unterzogen. Die Lyse erfolgt in Gegenwart von stark denaturierendem Guanidin-Isothiocynat (GITC)-Puffer, durch welchen Rnasen sofort inaktiviert werden, und die Isolierung intakter RNA gewährleistet wird. Die Zugabe von EtOH ist nötig, um die Bindung von RNA an eine Silica-Gel-Membran in Gegenwart eines Hochsalzpuffers zu vermitteln. Nach Waschschritten, durch welche Verunreinigungen wie DNA und Proteine aus der Säule gespült werden, wird die RNA in 30 µl RNase freiem H₂O eluiert und bei -70°C bis zur Analyse gelagert.

4.9.2. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zum Nachweis von RNA mittels PCR wurde an der einsträngigen RNA mittels einer retroviralen reversen Transkriptase (RT) eine zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese cDNA dient bei der PCR als Matrize. Für diesen Prozess wird der *1st Strand cDNA Synthesis Kit* mit AMV reverse Transkriptase (Boehringer, Mannheim) und das *RNase-free Dnase Set* (Qiagen, Hilden) verwendet. Der Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese wird in 0,2 ml PCR Reaktionsgefäßen auf Eis in einem Gesamtvolumen von 20µl hergestellt:

4 µl 5 x RT Puffer (500 mM Tris, 500mM KCl, 40 mM MgCl₂, pH 8,3)
 2 µl dNTP
 0,25µl Random Hexamers p(dN)₆
 2,6µl AMV Reverse Transkriptase
 0,8µl Rnase Inhibitor (40 U/ l)
 5,35µl H₂O bidest
 5µl RNA

Die cDNA-Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen:

10 Min 25°C: Binden der Oligonukleotide an die RNA
 60 Min 42°C: Überschreiben der RNA in cDNA
 5 Min 99°C: Inaktivierung der Reversen Transkriptase
 4°C: Beendigung der Reaktion

4.10. Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen

4.10.1. Medien und Lösungen

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 6,8 - 7,0 mit 1 N NaOH einstellen, Lagerung bei 4°C

TEP: 6 mM EDTA, 0,1-0,2% Trypsin (Fa. Gibco) in PBS

Penicillin/Streptomycinlösung (100x): 1,212 g Ampicillin / 200 ml (10000 U/ml), 2 g Streptomycin / 200 ml (10 mg/ml), zum Lösen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, Lagerung bei -20°C

Glutaminlösung (100x): 29,23 g Glutamin in 1 l lösen, Lagerung bei -20°C

DME-Medium (*Dulbecco's Modification of Eagles Medium*): Man füllt Milliporewasser in 10 l Steilbrustflaschen, gibt die erforderliche Menge Pulvermedium (DME-Pulver von Fa. Flow) dazu und rührt mit einem Rührkern, bis das Medium vollständig gelöst ist. Nach Zugabe von 1/100 Volumen 1 M HEPES und 3,75 g/l NaHCO₃ wird das Medium in sterile Flaschen filtriert. Die Flaschen werden zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert, um eventuelle Kontaminationen zu erkennen, und anschließend bei 4 °C gelagert.

Vor Gebrauch wird dem Medium 10 % FCS sowie 1/100 Volumen Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt und gut gemischt.

4.10.2. Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem nassbegasteten Brutschrank kultiviert. Für die verwendeten Zelltypen werden die oben angegebenen Medien verwendet. Je nach Zelldichte sollte alle 2 bis 5 Tage das Medium

gewechselt werden. Sind die Zellen konfluent, werden sie umgesetzt (passagiert).

4.10.3. Passagieren

Die zu passagierenden Zellen werden vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen mit einem dünnen Film TEP überschichtet. Nach einigen Minuten lösen sich die Zellen von der Oberfläche. Die Zellsuspension wird zur Inaktivierung des Trypsins in mindestens der doppelten Menge serumhaltigen Mediums aufgenommen. Noch lose auf dem Boden des Kulturgefäßes haftende Zellen werden mit Hilfe einer Pipette abgespült. Ein Aliquot der Zellsuspension wird gezählt und die Zellen in der gewünschten Konzentration in einem neuen Kulturgefäß mit frischem Medium ausgesät.

4.10.4. Langzeitlagerung von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen einer kleinen Flasche (ca. 3×10^6 Zellen) werden mit PBS gewaschen und mit 1 ml TEP abgelöst. Man nimmt die Zellsuspension in 4 ml Medium auf und zentrifugiert 5 min bei 1000 UpM (Hettich Rotanta/S). Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 2 ml kaltem FCS mit 5,6 % DMSO aufgenommen, auf 3 bis 4 Einfrierröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) aliquotiert und sofort auf Eis gestellt. Man belässt die Röhrchen maximal 60 Minuten auf Eis, verpackt sie in Zellstoff und lagert sie in Styroporkästen bei -70°C . Nach ca. 12 Stunden können sie in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen. Dazu erwärmt man die Röhrchen im 37°C -Wasserbad und nimmt die Zellsuspension in 10 ml Medium auf, um das DMSO zu verdünnen. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in eine kleine Flasche überführt.

4.10.5. Virusinduktion

Der IFN- β Promotor ist in nicht-induzierten Zellen nahezu ruhig gestellt, kann aber durch Zugabe verschiedenster Stimuli (z.B. durch Viren) aktiviert werden. Dieses gilt sowohl für den endogenen IFN- β Promotor, als auch für artifizielle Reportergenkonstrukte, die unter der Kontrolle des IFN- β Promotors stehen.

Für eine Virusinduktion mit NDV (*newcastle disease virus*) werden $2,5 \times 10^5$ Zellen eines entsprechenden stabilen Klongemisches in einer 6-well Platte ausgesät. 48 h später werden die Zellen zunächst zweimal mit PBS und anschließend zweimal mit serumfreiem DME-Medium gewaschen. Pro zu induzierendem Ansatz wird 1 ml NDV-Suspension (NDV 1/1600 in serumfreiem DME-Medium) zu den Zellen gegeben und 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Virusinduktion durch dreimaliges Waschen mit serumhaltigem DME-Medium abgestoppt. Anschließend werden die Zellen mit Selektionsmedium überschichtet und weitere 24 h bei 37°C im Inkubator aufbewahrt.

4.10.6. Interferon Test

Färbelösung: 50 g Kristallviolett, 8,5 g NaCl, 143 ml 37%iges Formaldehyd, 500 ml EtOH, mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Die Zellen einer nahezu konfluenten 6-Loch-Platte werden, wie unter 4.10.5. *Virusinduktion* beschrieben, mit NDV induziert. Nach 24 h Inkubationszeit wird 1 ml Zellkulturüberstand abgenommen, und der Interferontiter wie folgt bestimmt:

Vero-Zellen werden auf Mikrotiterplatten in DME-Medium in einer Konzentration von etwas 1000 Zellen/Loch ausgesät, so dass die Platten am nächsten Tag konfluent bewachsen sind. Die zu testenden Überstände werden neben einem Interferonstandard (Konzentration: 500 U/ml) in die oberste Reihe der Platten gegeben. In den Folgereihen werden 1:1 Verdünnungsstufen der Überstände und des Standard angelegt. Nach 24 h wird das Medium entfernt und je 100 µl einer Virussuspension (DME-Medium mit 5 % FCS, 1/30000 VSV (*vesicular stomatitis virus*)) pro Loch der Mikrotiterplatten auf die Zellen gegeben. Die durch Virusinfektion ausgelöste Lyse kann nach weiteren 24 h unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Der Virusüberstand wird abgenommen und mit 2,5%igem Formaldehyd inaktiviert. Die durch Interferon geschützten, noch lebenden Zellen werden mit der Kristallviolett-Färbelösung angefärbt. Durch den Vergleich mit dem Interferonstandard wird der Interferontiter der Überstände bestimmt.

4.10.7. Metaphasespreads

Um Metaphasechromosomen aus Zellen zu isolieren, müssen sich die Zellen in einem aktiven Replikationszyklus befinden, d.h. sie dürfen nicht konfluent sein. Durch Zugabe von 0,04 µg Colcemid (Stocklösung 10 µg/ml) pro ml Kulturmedium 2 bis 4 h vor der Zellernte kann der Anteil an sich in der Mitose befindenden Zellen erhöht werden. Colcemid wirkt als Spindelgift, das sich teilende Zellen in der Metaphase der Mitose arretiert. Nach bis zu 4 h Inkubationszeit werden die Zellen mit Trypsin geerntet, der alte Medienüberstand wird zum Abstoppen der Trypsinwirkung eingesetzt. Der Medienüberstand enthält möglicherweise mitotische Zellen, die sich aufgrund des größeren Zellvolumens von der Kulturschale abgelöst haben. Die Zellen werden auf vier 2 ml Eppendorfgefäße verteilt und bei 400 x g pelletiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in der Restflüssigkeit durch vortexen resuspendiert und anschließend 1,5 ml hypotonische Salzlösung zugegeben. Die Salzlösung besteht entweder aus 0,075 mM KCl oder einer Mischung aus 0.9% Natriumcitrat und KCl im Verhältnis 1:1 oder 1:20. Nach 1 bis 5minütiger Inkubationszeit werden die Zellen bei 400 x g pelletiert und mit 1,5 ml kalter Methanol/Eisessig (3:1) Lösung 10 bis 30 min auf Eis fixiert. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt, bevor die Zellen über Nacht im Kühlschrank fixiert werden. Am nächsten Tag werden die Zellen noch zweimal mit der Fixierungslösung gewaschen und anschließend ca. 20 µl der Zellsuspension auf einen eiskalten Objektträger getropft. Die Tropfhöhe beträgt ca. 30 cm. Die getropften Präparate werden kurz durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen, getrocknet und die Qualität unter einem Lichtmikroskop bewertet und sie werden bei -20°C gelagert.

4.11. Arbeiten mit *E. coli*

4.11.1. Kultivierung von Bakterien

LB-Medium:	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, autoklavieren
SOC-Medium:	20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ (SOB-Medium), autoklavieren; das autoklavierte SOB-Medium wird nach dem Abkühlen mit 20 mM Glucose (e.c.) versetzt
Agarplatten:	Pro Liter LB-Medium werden 15 g Agar zugegeben. Zur Herstellung ampicillinhaltiger Agarplatten wird 1/1000 Volumen Ampicillin einer steriltfiltrierten Stammlösung (50 mg/ml in Ethanol) beigemischt. Kanamycinplatten enthalten 50 µg/ml Kanamycin anstelle von Ampicillin.

E. coli-Zellen werden in Flüssigmedien (LB ± Antibiotikum) bei 37°C unter Schütteln angezogen. Dazu werden 5 ml Kulturmedium mit einer *E. coli*-Kolonie (Einzelklone von Agarplatte) angeimpft. Nach 6 bis 8 Stunden kann die Hauptkultur mit einem Volumen von 50-1000 ml mit der Vorkultur angeimpft werden.

4.11.2. Herstellung kompetenter Bakterien

1 l LB-Medium wird mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Man lässt die Zellen bei 37°C unter starkem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 wachsen und zentrifugiert sie anschließend 10 min in einem vorgekühlten GS3-Rotor bei 3000 UpM ab. Das Zellpellet wird nun in 1 l kaltem Wasser resuspendiert und wie beim erstenmal zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 500 ml kaltem Wasser aufgenommen und wiederum wie oben zentrifugiert. Nun wird das Pellet in 20 ml kaltem 10%igen Glycerin resuspendiert, wie oben beschrieben zentrifugiert und schließlich in einem Endvolumen von 2 bis 3 ml 10%igem Glycerin resuspendiert. Die so aufgenommenen Zellen werden in 50µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.11.3. (Elektro-)Transformation von *E.coli*

Für die Transformation wird ein 50 µl Aliquot der kompetenten Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis gestellt. 1 µl einer Plasmid-DNA oder eines Ligationsansatzes wird hinzugegeben, gut gemischt, und der Ansatz wird in eine sterile, vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Anschließend wird die Küvette in der Elektrotransformationskammer einem elektrischen Feld ausgesetzt. Pulse Controller und Gene Pulser werden auf 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω eingestellt. Die Zeitkonstante, die am Gerät überprüft werden kann, sollte 4 bis 5 ms betragen, die elektrische Feldstärke beträgt dann 112,5 kV/cm. Danach werden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein Kapsenberg Röhrchen überführt und bei 37°C 20 bis 30 min geschüttelt. Anschließend werden unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert. Man lässt die Klone über Nacht bei 37°C heranwachsen und kann sie dann durch eine „Mini“-Plasmidpräparation charakterisieren.

4.11.4. Anlage von Glycerinkulturen

Ein kurzfristiges Aufbewahren (bis 6 Wochen) von auf Agarplatten ausgestrichenen Bakterienkolonien erfolgt im Kühlraum bei 4°C. Eine langfristige Lagerung ist als Stammkultur möglich. Hierzu wird 87%iges Glycerin im Verhältnis 1:1 mit einer Übernachtskultur gemischt und bei -70 °C gelagert.

4.12. Methoden zur Kernmatrixpräparation (*scaffold preparation*)

4.12.1. Die Lithium-3,5-diiodosalicylat (LIS)-Extraktionsmethode

- Stocklösungen:
- Tris/HCl 1 mol/l, pH 7,4
 - MgCl₂ 1 mol/l
 - Li-acetat 1 mol/l
 - NaCl 1 mol/l
 - KCl 1 mol/l
 - HEPES 100 mmol/l, pH 7,4, mit NaOH einstellen)
 - EDTA 0,5 mol/l, pH 8
 - K-EDTA 50 mmol/l (2,92 g freie Säure lösen, pH auf 7,4 mit KOH einstellen und auf 200 ml auffüllen)
 - Spermine-Tetrahydrochlorid 0,5 mmol/l
 - Spermidine-Trihydrochlorid 1,25 mmol/l
 - Digitonin 1% (in der Mikrowelle lösen)
 - PMSF 0,1 mol/l (in Isopropanol lösen)
- Isolierungspuffer: 3,75 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4, 0,05 mmol/l Spermine, 0,125 mmol/l Spermidine, 0,5 mmol/l K-EDTA, 1% Thiodiglycol (frisch zugeben)
- Kernstabilisierungspuffer: 20 ml 5 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4, 0,05 mmol/l Spermine, 0,125 mmol/l Spermidine, 20 mmol/l KCl, 1% Thiodiglycol
- LIS-Puffer: 100 mmol/l Li-Acetat, 20 mmol/l HEPES, pH 7,4, 1 mmol/l EDTA
- LIS-Lösung (25 mM): 94 mg LIS in 1 ml 1% Digitonin lösen und 9 ml LIS-Puffer zugeben
- Restriktionspuffer (500 ml): 20 mmol/l Tris/HCl, pH 7,4, 0,05 mmol/l Spermine, 0,125 mmol/l Spermidine, 20 mmol/l KCl, 70 mmol/l NaCl, 10 mmol/l MgCl₂
steril filtrieren, Lagerung bei 4°C
- Proteinase K-Puffer: 5% SDS; 50 mmol/l EDTA, 0,2 mol/l Tris/HCl, pH 8,5

Isolierung von Zellkernen

Zellen, typischerweise Maus-24-Fibroblasten, werden auf großen Platten (12 cm Durchmesser) ausgesät. Für ein Experiment werden Zellkerne von 2 konfluent bewachsenen Platten (~5x10⁷ Zellen) geerntet. Soweit nicht anders erwähnt, werden die verwendeten Lösungen im Eisbad vorgekühlt. Die Digitonin-Lösung wird vor Gebrauch in der Mikrowelle aufgeköcht.

Die vom Medium befreiten Platten werden zweimal mit je 15 ml Isolierungspuffer (supplementiert mit 0,1% der PMSF-Stammlösung) gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 7,5 ml Isolierungspuffer + 0,1% Digitonin versetzt und von der Kulturschale abgeschabt. Die Zellsuspension von zwei großen Platten wird vereinigt und das Gesamtvolumen von 15 ml in einen

Dounce-Homogenisator überführt. Durch 12maliges Auf- und Abbewegen eines S-Pistill (S: *strong*) werden die Zellkerne freigesetzt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 1000 x g und 4°C wird das erhaltene Kernpellet mit 5 ml Isolierungspuffer + 0,1% Digitonin durch 4maliges Bearbeiten mit einem L-Pistill (L: *loose*) gewaschen.

LIS-Extraktion

Nach der Isolierung werden die Zellkerne in 200 µl Kernstabilisierungspuffer für 30 min bei 42°C hitzestabilisiert. Anschließend werden die stabilisierten Kernpellets mit 4 ml LIS-Lösung (25 µM) extrahiert. Durch 4maliges bearbeiten mit dem L-Pistill werden die Zellkerne resuspendiert und gegebenenfalls 2 mal mit dem S-Pistill bearbeitet. Ein genügend extrahiertes Pellet ist durch ein zähes Aussehen und schwebende Teilchenreste gekennzeichnet. Der so erhaltene DNA-Halo wird über eine 5minütige Zentrifugation bei 4500 UpM (g) pelletiert. Das deutlich im Volumen vergrößerte, viskose Pellet wird in 20 ml Restriktionspuffer (supplementiert mit 0,1% PMSF-Stammlösung) aufgenommen und 30 Minuten auf einer Wippe bei Raumtemperatur gewaschen. Dieser Waschvorgang wird zweimal mit je 10 ml Restriktionspuffer wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet mit 500 µl Restriktionspuffer versetzt und nach Zugabe von 5-50% Glycerin bei -70°C gelagert.

4.12.2. Die modifizierte Hochsalzextraktionsmethode

FSB: 50 mM HEPES, 10 mM NaCl, 5 mM (CH₃CO₂)²Mg, pH 7,5, 25% Glycerin
Kernisolierungspuffer (CSK): 10 mM Pipes, pH 6,8, 100 mM NaCl, 0,3 M Sucrose, 30 mM MgCl₂, 1% TritonX-100
Hochsalzpuffer: 2 M NaCl; 10 mM Pipes, pH 6,8, 10 mM EDTA, 0,1% Digitonin, 0,05 mM Spermine, 0,125 mM Spermidine
10x PBS: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 14,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Anstelle von Detergenzien wie LIS als Extraktionsmittel kann auch eine 2M NaCl-Lösung zur Proteinextraktion und damit zur Kernmatrix-Extraktion verwendet werden. Im Gegensatz zur LIS-Extraktion reflektiert die Salzextraktion auch den transkriptionellen Status der Zelle.

Isolierung von Zellkernen

Die Zellen werden wie bei der LIS-Extraktion geerntet, wenn die Kulturschalen konfluent bewachsen sind. Die Zellen werden trypsinisiert und entweder direkt zur Zellkernisolierung eingesetzt oder in FSB bei -70°C zwischengelagert. In jedem Fall, entweder nach dem Ernten oder dem Auftauen, werden die Zellen zweimal mit je 5 ml 1x PBS gewaschen. Danach werden die Zellkerne 15 min in kaltem Kernisolierungspuffer inkubiert. Anschließend wird die DNA in einem Gesamtvolumen von 500 µl mit 400-600 U Eco RI in Restriktionspuffer über Nacht bei 37°C verdaut. Es bilden sich weiße Flocken aus, die durch Pipettieren homogenisiert werden müssen, bevor das Volumen angepasst und der Verdau auf Aliquots mit je 100 µl aufgeteilt und bei -20°C gelagert werden kann.

Hochsalzextraktion auf Objektträgern

Für sich anschließende Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) werden die isolierten Zellkerne mit einer Zellzahl von $1,5 \times 10^4$ in einem Volumen von 50 μl auf einen Glasobjektträger zentrifugiert. Dazu werden eine Cytospin der Firma ThermoShandon und Beladevorrichtungen, sogenannte *Cytofunnel*, verwendet. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 800 UpM werden die Objektträger für ungefähr 5 min mit einer 1x PBS Lösung in Glasfärbekästen gewaschen. Anschließend werden die Objektträger 2-5 min (abhängig von der Zelllinie) mit der 2M NaCl-Extraktionslösung behandelt. Dieser Inkubationsschritt führt zur Extraktion löslicher Kernproteine wie Histone und damit zu einer Halo-förmigen Schlaufenstruktur der DNA. Die Objektträger werden für je 2 min in 10x, 5x, 2x und 1x PBS gewaschen und anschließend für je 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol dehydriert. Für eine endgültige Fixierung werden die Präparate 2 h bei 65°C gebacken, die Lagerung erfolgt bei -20°C.

4.12.3. Reassoziationsexperimente

Die unter 4.12.1. beschriebenen Aliquots à 100 μl verdautem Zellextrakt werden aufgetaut, mit je 50 μl *E.coli* Kompetitor-DNA (4.4.6. Gewinnung von Kompetitor-DNA aus *E.coli*) versetzt und 30 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend werden ca. 200000 *counts* (in der Regel 50-100 ng DNA pro Ansatz) der zu testenden, mit [³⁵S]dATP radioaktiv markierten, DNA-Fragmente zugesetzt. Bei unterschiedlich großen Fragmenten ist auf Äquimolarität zu achten. Die Ansätze werden über Nacht bei 37°C unter Schütteln in einem Thermomixer inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation werden die Ansätze bei 13000 UpM und 4°C pelletiert. Die Überstände werden abgenommen und erneut zentrifugiert, um eventuell vorhandene Pelletreste zu entfernen. Die Überstände werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 50 μl Proteinase K-Lösung (1 ml/ml) versetzt. Die Pelletfraktionen werden zweimal mit 200 μl Restriktionspuffer gewaschen und ebenfalls mit 50 μl Proteinase K-Lösung versetzt. Beide Fraktionen werden bei 56°C unter Schütteln inkubiert, wobei den Pelletfraktionen noch zweimal Proteinase K-Lösung zugesetzt wird. Abschließend wird die DNA mit Glykogen als Präzipitationshilfe gefällt. Die Fraktionen werden mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 μl TE gelöst.

4.12.4. Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

In der Regel werden die getesteten DNA-Fragmente nach dem *modified equal counts approach* aufgetragen (Kay und Bode 1995). Dazu ist ein Kontrollansatz nötig, der ein stark bindendes S/MAR-Fragment und einen nicht-bindenden Vektoranteil enthält. Das stark bindende S/MAR-Element sollte zu 95%-100% in der Pelletfraktion, das Vektorrückgrat dagegen zu 100% im Überstand zu finden sein. Ist das nicht der Fall, kann ein Korrekturfaktor ermittelt werden. In der Regel wird angestrebt, 3000 cpm pro Probe auf ein Agarosegel aufzutragen. Nach Ende der Laufzeit wird das Gel geblottet (4.8.1. *Southern Blotting*- ohne Hybridisierung und Waschen) und die Membran exponiert.

4.13 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

4.13.1. Herstellung der DNA-Sonden mittels Nick-Translation

Die Methode der Nick-Translation beruht darauf, dass DNase I bei niedriger Enzymkonzentration an statistisch verteilten Stellen eines DNA-Substrates Einzelstrangsnitte, sogenannte *nicks*, erzeugt. DNA-Polymerase I benutzt die entstehenden 3'-OH-Enden als Primer für die DNA-Synthese. Die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der DNA Polymerase entfernt dabei gleichzeitig die Nukleotide in Syntheserichtung. Die durch die Exonuklease-Aktivität abgebauten Nukleotide werden durch die Polymerase-Aktivität mit markierten Nukleotiden (Digoxigenin-11-UTP, Biotin-16-UTP, Fluorescein-12-UTP, Tetramethylrhodamin-5-UTP) ersetzt. Ein typischer Reaktionsansatz mit dem *Nick Translation Kit* von Roche sieht wie folgt aus:

dNTP-Lösung: 1 vol 0,4 mM Dig-11-UTP (oder andere Markierung)
 2 vol dTTP (0,4 mM)
 3 vol dATP (0,4 mM)
 3 vol dCTP (0,4 mM)
 3 vol dGTP (0,4 mM)

Reaktionsgemisch: 2 µg DNA
 10 µl dNTP Lösung
 2 µl 10x Puffer
 auf 18 µl mit aq. bidest auffüllen
 2 µl Enzym-Gemisch DNase I / DNA-Polymerase

Die Nick-Translationsreaktion wird für 90-180 min bei 15°C inkubiert. Da die Hybridisierungseffizienz stark von der Fragmentgröße der markierten Sonde abhängt, wird die Fragmentgröße vor dem Abstoppen der Reaktion auf einem Agarosegel (4.6.1. Agarosegele) überprüft. Sonden mit durchschnittlichen Fragmentgrößen oberhalb des optimalen Bereichs von 200-500 Nukleotiden resultieren meist in fleckigen Hintergrundsignalen, die durch unspezifische Anheftung der Sonde an die Glasoberfläche entstehen. Außerdem kann die Hybridisierungseffizienz aufgrund der Zugänglichkeit verringert werden. Sonden mit extrem kurzen Fragmenten dagegen beeinträchtigen die Sensitivität aufgrund der schnellen Rehybridisierungskinetik. Bei Erreichen der optimalen Fragmentgröße wird die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8 und Erhitzen auf 65°C für 10 min gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch eine Alkoholfällung abgetrennt. Die markierten Sonden werden bei -20°C gelagert.

4.13.2. *In situ* Hybridisierung

Hybridisierungspuffer: 6,5 ml Formamid, 1,3 ml 20x SSC, 0,65 g Dextran-sulfat, 1 ml Heringsperm-DNA (c = 1 mg/ml), 26 µl 0,5 M EDTA, 1,3 ml NaH₂PO₄-Puffer (0,5 M), pH 7,4
Denaturierungslösung: 70% deionisiertes Formamid in 2x SSC
10x PBD-Puffer: von Fa. Qbiogene

Die zu hybridisierenden Objektträger werden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und in einer Lösung von Methanol/Eisessig (3:1) für 10 min refixiert. Die Objektträger werden getrocknet und anschließend in 70%iger Formamidlösung bei 72°C für 2 min denaturiert. Durch ansteigende Konzentration

rationen an Ethanol (70%, 90% und 100%) werden die Präparate dehydriert und bei Raumtemperatur getrocknet.

10 µl der markierten DNA-Sonde (4.13.1.) werden mit 10 µl Cot-DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriunacetat und 200 µl eiskaltem Ethanol gefällt. Das Pellet wird später in 10 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen, und die Lösung wird bei 80°C für 10 min im Heizblock denaturiert. Die Sonde wird bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Zur Hybridisierung wird die Sonde auf das zu untersuchende Präparat gegeben und mit einem Plastikdeckgläschen bedeckt. Die Ränder werden mit Kleber zum Schutz vor Austrocknung versiegelt. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht.

4.13.3. Detektionssysteme für *in situ* Hybridisierungen

Indirekte Digoxigenin-11-UTP Markierung

Puffer 1	100 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl (pH 7,5)
Blockierungspuffer	0,5% Blockierungsreagenz (Roche) in Puffer 1
Waschpuffer	0,05% Tween > 20 in Puffer 1
Detektionspuffer	100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ , pH 8
Fast Red TR Lösung	25 mg/ml Fast Red TR in aq. dest.
HNPP	10 mg/ml in DMF

Direkt markierte Sonden

Nach der Hybridisierung werden die Objektträger kurz in 2x SSC bei RT, und anschließend in 0,5x SSC bei 72°C, und 3 mal in 1 x PBD bei RT jeweils 5 min gewaschen. Die Präparate werden getrocknet und die DNA mit DAPI gegengefärbt.

Nach der Hybridisierung werden die Objektträger in 2x SSC bei RT, 72°C, 37°C für jeweils 5 min gewaschen. Zur Signal-Detektion werden die Präparate nach den Waschschritten mit einer Anti-Digoxigenin-AP Antikörperlösung (1:500 in Blockierungspuffer verdünnt) inkubiert. Die Inkubation erfolgt bei 37°C in einer feuchten Kammer für eine Stunde. Die Objektträger werden dreimal für 10 min in Waschpuffer und zweimal für 10 min in Detektionspuffer gewaschen. Das HNPP / Fast Red Detektionsgemisch wird im Verhältnis 1:1 in Detektionspuffer (10 µl HNPP, 10 µl Fast Red, 1 ml Puffer) angesetzt und mit einem 0,2 µm Nylonfilter filtriert, um unspezifisches Präzipitat zu entfernen. Bis zum Gebrauch wird der HNPP-Mix dunkel auf Eis gelagert. 20-50 µl des filtrierten Detektionsgemisches werden auf den Objektträger gegeben und mit einem Plastikdeckgläschen abgedeckt. Nach 30minütiger Inkubation bei RT wird für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und die Signalintensität gegebenenfalls nochmals mit HNPP/ Fast Red verstärkt. Der Detektionsschritt kann je nach Kopienzahl bis zu dreimal wiederholt werden, was sich vor allem bei Einzelkopiesequenzen anbietet. Nach dem letzten Detektionsschritt wird das Präparat für 10 min mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Die hybridisierte DNA wird mit DAPI gegengefärbt.

4.13.4. Immunofärbung

Die präparierten Objektträger (4.12.2. Die modifizierte Hochsalzextraktionsmethode) werden in 1:1 Methanol:Eisessig bei RT für 10 min refixiert und anschließend in 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach einem initialen

Blockierungsschritt für 1 h in PBS werden die Objektträger mit dem primären Antikörper (Santa Cruz, 1:100 in PBS) bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit PBS + 0,2% Tween sind alle Antikörperreste entfernt. Nun werden die Zellen für 45 min bei RT mit einem Fluorescein-Isotiozyanat-gelabelten Gans-anti-Maus Immunoglobulin G Antikörper (Jackson) für 1 Stunde im Dunkeln in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden wie beschrieben gewaschen, getrocknet und die DNA wird mit DAPI-Lösung angefärbt.

4.13.5. Mikroskopische Auswertung der *in situ* Hybridisierungen

Die Bildauswertung von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen erfolgt unter einem Durchlichtmikroskop (Zeiss) über eine digitale CCD-Kamera. Die Auflösung der Kamera beträgt 1317 x 1035 Pixel. Standardmäßig wird bei Verwendung der CCD-Kamera ein 63er Ölimersionsobjektiv benutzt. Ein Filtersatz von OmegaOptical ermöglicht die Trennung von roter, grüner und blauer Fluoreszenz (Rot: Anregung = 540nm, Emission = 585 nm; Grün: Anregung = 475 nm, Emission = 535 nm; Blau: Anregung = 387 nm, Emission = 535 nm). Die erhaltenen Bilder werden mit Hilfe der Software *IPLab Spectrum* (Signal Analytics) bearbeitet. Diese ermöglicht die nachträgliche Kolorierung der schwarz/weiß Abbildungen, eine Überlagerung derselben und die Prozessierung auf 8 bit TIFF-Dateien.

5. Abkürzungen & Zeichen

A	Adenosin
α	alpha
Abb.	Abbildung
<i>amp</i>	Ampicillinresistenz-Gen
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BUR	<i>Base Unpairing Region</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure
cds	<i>coding sequence</i>
CHO-K1	<i>Chinese hamster ovary</i> -Zellen
cm	Zentimeter
cos	Cosmid
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
CT	Chromosomen-Territorium
CTCF	CCCTC-binding factor
CUE	<i>core unwinding element</i>

d.h.	das heißt
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N steht für Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymidin)
DHGP	Deutsches Humanes Genomprojekt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Desoxyribonuklease I
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
enh	Enhancer
et al.	<i>et altera</i> , und andere
γ	gamma
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMW-DNA	<i>high molecular weight</i> DNA
HNPP	2-Hydroxy-3-Naphtoicacid-2'-Phenylanilid Phosphat
ICD	Interchromatin-Domäne
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
K	Klon
kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
λ	lambda
LCR	<i>locus control region</i>
LIS	Lithium-Diiodosalicylat
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	molar
mA	Milliampère
MAR	<i>Matrix Attachment Region</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MLV	Maus-Leukämie-Virus
mRNA	messenger-RNA

<i>neo</i>	Neomycin-Phosphotransferase
nm	10 ⁻⁹ Meter
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
Ori	<i>Origin of replication</i>
P	Plasmid
P	Pellet
PAC	<i>Phage Artificial Chromosome</i>
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEV	<i>Position Effect Variegation</i>
pH	neg. dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
pmol	10 ⁻¹² Mol
RMCE	<i>Recombinase-Mediated Cassette Exchange</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	<i>supernatant</i> / Überstand
s.o.	siehe oben
SAR	<i>Scaffold Attachment Region</i>
S/MAR	<i>Scaffold/Matrix Attachment Region</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIDD	<i>stress induced duplex destabilization</i>
SIV	<i>Simiane</i> Immundefizienz-Virus
sec	Sekunde
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	<i>Units</i> , Einheit zur Kennzeichnung von Enzymaktivitäten
u.a.	unter anderem
UE	<i>Unpairing Elements</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

6. Literatur

Adachi Y., Kas E., & Laemmli U.K. (1989) Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J.* **20;8**, 3997-4006.

Aebi U., Cohn J., Buhle L., & Gerace L. (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature.* **323**, 560-564.

Altmann S.M., Mellon M.T., Distel D.L., & Kim C.H. (2003) Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Virol.* **77**, 1992-2002.

Amati B. & Gasser S.M. (1990) *Drosophila* scaffold-attached regions bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeasts. *Mol. Cell Biol.* **10**, 5442-5454.

Antes T.J., Namciu S.J., Fournier R.E., & Levy-Wilson B. (2001) The 5' boundary of the human apolipoprotein B chromatin domain in intestinal cells. *Biochemistry.* **40**, 6731-6742.

Ashburner M., Chihara C., Meltzer P., & Richards G. (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **38**, 655-662.

Baer A., Schubeler D., & Bode J. (2000) Transcriptional properties of genomic transgene integration sites marked by electroporation or retroviral infection. *Biochemistry.* **20;39**, 7041-7049.

Baer A. & Bode J. (2001) Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 473-480.

Barker D.D., Wu H., Hartung S., Breindl M., & Jaenisch R. (1991) Retrovirus-induced insertional mutagenesis: mechanism of collagen mutation in Mov13 mice. *Mol. Cell Biol.* **11**, 5154-5163.

Bell A., Boyes J., Chung J., Pikaart M., Prioleau M.N., Recillas F., Saitoh N., & Felsenfeld G. (1998) The establishment of active chromatin domains. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**, 509-514.

Bell A.C. & Felsenfeld G. (1999) Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 191-198.

Bell A.C., West A.G., & Felsenfeld G. (2001) Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science.* **19;291**, 447-450.

- Benham C.J., Kohwi-Shigematsu T., & Bode J. (1997) Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J.Mol.Biol.* **274**, 181-196.
- Benham C.J. (1996A) Duplex destabilization in superhelical DNA is predicted to occur at specific transcriptional regulatory regions. *J.Mol.Biol.* **255**, 425-434.
- Benham C.J. (1996B) Computation of DNA structural variability--a new predictor of DNA regulatory regions. *Comput.Appl.Biosci.* **12**, 375-381.
- Berezney R. & Coffey D.S. (1974) Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **60**, 1410-1417.
- Berezney R., Mortillaro M.J., Ma H., Wei X., & Samarabandu J. (1995) The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int.Rev.Cytol.* **162A**, 1-65.
- Bi C. & Benham C.J. (2004) WebSIDD: server for predicting stress-induced duplex destabilized (SIDD) sites in superhelical DNA. *Bioinformatics.* **20**, 1477-1479.
- Blasquez V.C., Xu M., Moses S.C., & Garrard W.T. (1989) Immunoglobulin kappa gene expression after stable integration. I. Role of the intronic MAR and enhancer in plasmacytoma cells. *J.Biol.Chem.* **264**, 21183-21189.
- Blobel G. (1985) Gene gating: a hypothesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **82**, 8527-8529.
- Bode J., Pucher H.J., & Maass K. (1986) Chromatin structure and induction-dependent conformational changes of human interferon-beta genes in a mouse host cell. *Eur.J.Biochem.* **158**, 393-401.
- Bode J. & Maass K. (1988) Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry.* **27**, 4706-4711.
- Bode J., Kohwi Y., Dickinson L., Joh T., Klehr D., Mielke C., & Kohwi-Shigematsu T. (1992) Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science.* **255**, 195-197.
- Bode J., Stengert-Iber M., Kay V., Schlake T., & Dietz-Pfeilstetter A. (1996) Scaffold/matrix-attached regions: topological switches with multiple regulatory functions. *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **6**, 115-138.
- Bode J., Schlake T., Iber M., Schubeler D., Seibler J., Snezhkov E., & Nikolaev L. (2000) The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol.Chem.* **381**, 801-813.

- Bode J., Benham C., Ernst E., Knopp A., Marschalek R., Strick R., & Strissel P. (2000A) Fatal connections: when DNA ends meet on the nuclear matrix. *J.Cell Biochem.Suppl.* **35**, 3-22.
- Bode J., Benham C., Knopp A., & Mielke C. (2000B) Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **10**, 73-90.
- Bode J., Goetze S., Heng H., Krawetz S.A., & Benham C. (2003) From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. *Chromosome.Res.* **11**, 435-445.
- Bode J., Winkelmann S., Gotze S., Spiker S., Tsutsui K., Bi C., A K P, & Benham C. (2006) Correlations between scaffold/matrix attachment region (S/MAR) binding activity and DNA duplex destabilization energy. *J.Mol.Biol.* **358**, 597-613.
- Bonifer C., Yannoutsos N., Kruger G., Grosveld F., & Sippel A.E. (1994) Dissection of the locus control function located on the chicken lysozyme gene domain in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4202-4210.
- Boulikas T. (1993) Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix. *J.Cell Biochem.* **52**, 14-22.
- Boulikas T. (1995) Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int.Rev.Cytol.* **162A**, 279-388.
- Boulikas T. (1996) Common structural features of replication origins in all life forms. *J.Cell Biochem.* **60**, 297-316.
- Bridger J.M., Herrmann H., Munkel C., & Lichter P. (1998) Identification of an interchromosomal compartment by polymerization of nuclear-targeted vimentin. *J.Cell Sci.* **111**, 1241-1253.
- Bushman F., Lewinski M., Ciuffi A., Barr S., Leipzig J., Hannenhalli S., & Hoffmann C. (2005) Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat.Rev.Microbiol.* **3**, 848-858.
- Carri M.T., Micheli G., Graziano E., Pace T., & Buongiorno-Nardelli M. (1986) The relationship between chromosomal origins of replication and the nuclear matrix during the cell cycle. *Exp.Cell Res.* **164**, 426-436.

Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint B.G., Gross F., Yvon E., Nusbaum P., Selz F., Hue C., Certain S., Casanova J.L., Bousso P., Deist F.L., & Fischer A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. **288**, 669-672.

Chung J.H., Whiteley M., & Felsenfeld G. (1993) A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell*. **74**, 505-514.

Cockerill P.N. & Garrard W.T. (1986) Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell*. **44**, 273-282.

Cook P.R. (1988) The nucleoskeleton: artefact, passive framework or active site? *J.Cell Sci.* **90**, 1-6.

Cox R. & Mirkin S.M. (1997) Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 5237-5242.

Cremer T. & Cremer C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat.Rev.Genet.* **2**, 292-301.

Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S., Perry P., Teague P., & Bickmore W.A. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J.Cell Biol.* **145**, 1119-1131.

de Duve C. (1983) Lysosomes revisited. *Eur.J.Biochem.* **137**, 391-397.

Diaz M.O., Pomykala H.M., Bohlander S.K., Maltepe E., Malik K., Brownstein B., & Olopade O.I. (1994) Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig. *Genomics*. **22**, 540-552.

Dickinson L.A., Joh T., Kohwi Y., & Kohwi-Shigematsu T. (1992) A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell*. **70**, 631-645.

Dijkwel P.A. & Hamlin J.L. (1995) Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm. *Int.Rev.Cytol.* **162A**, 455-484.

Dobreva G., Dambacher J., & Grosschedl R. (2003) SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. *Genes Dev.* **17**, 3048-3061.

- Dunn K.L., Zhao H., & Davie J.R. (2003) The insulator binding protein CTCF associates with the nuclear matrix. *Exp.Cell Res.* **288**, 218-223.
- Fackelmayer F.O. (2000) Die Architektur des Zellkerns. *BioSpectrum* **6**, 441.
- Fey E.G. & Penman S. (1988) Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **85**, 121-125.
- Gall J.G. & Pardue M.L. (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **63**, 378-383.
- Garrard W.T. (1990) Chromosomal Loop Organization in Eucaryotic Genomes. In *Nucleic Acids and Molecular Biology* Springer Verlag, Heidelberg.
- Gasser S.M. & Laemmli U.K. (1986) Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell.* **46**, 521-530.
- Gasser S.M. & Laemmli U.K. (1987) Improved methods for the isolation of individual and clustered mitotic chromosomes. *Exp.Cell Res.* **173**, 85-98.
- Gasser S.M., Amati B.B., Cardenas M.E., & Hofmann J.F. (1989) Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function. *Int.Rev.Cytol.* **119**, 57-96.
- Gerace L. & Burke B. (1988) Functional organization of the nuclear envelope. *Annu.Rev.Cell Biol.* **4**, 335-374.
- Goetze S., Huesemann Y., Baer A., & Bode J. (2003) Functional characterization of transgene integration patterns by halo fluorescence in situ hybridization: electroporation versus retroviral infection. *Biochemistry.* **42**, 7035-7043.
- Goetze S. (2003A) *Dissertation: Funktionsanalysen nicht-kodierender genomischer DNA-Bereiche unter Berücksichtigung biomathematischer Modelle.*
- Goetze S., Baer A., Winkelmann S., Nehlsen K., Seibler J., Maass K., & Bode J. (2005) Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci. *Mol.Cell Biol.* **25**, 2260-2272.
- Gohring F., Schwab B.L., Nicotera P., Leist M., & Fackelmayer F.O. (1997) The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown. *EMBO J.* **16**, 7361-7371.

- Gohring F. & Fackelmayer F.O. (1997) The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry*. **36**, 8276-8283.
- Goldman M.A. (1988) The chromatin domain as a unit of gene regulation. *Bioessays*. **9**, 50-55.
- Gonzalez-Melendi P., Beven A., Boudonck K., Abranches R., Wells B., Dolan L., & Shaw P. (2000) The nucleus: a highly organized but dynamic structure. *J.Microsc.* **198**, 199-207.
- Gorlich D. & Mattaj I.W. (1996) Nucleocytoplasmic transport. *Science*. **271**, 1513-1518.
- Hardy M.P., Owczarek C.M., Jermini L.S., Ejdeback M., & Hertzog P.J. (2004) Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics*. **84**, 331-345.
- Hassan A.B. & Cook P.R. (1993) Visualization of replication sites in unfixed human cells. *J.Cell Sci.* **105**, 541-550.
- He D.C., Nickerson J.A., & Penman S. (1990) Core filaments of the nuclear matrix. *J.Cell Biol.* **110**, 569-580.
- Hematti P., Hong B.K., Ferguson C., Adler R., Hanawa H., Sellers S., Holt I.E., Eckfeldt C.E., Sharma Y., Schmidt M., von Kalle C., Persons D.A., Billings E.M., Verfaillie C.M., Nienhuis A.W., Wolfsberg T.G., Dunbar C.E., & Calmels B. (2004) Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS.Biol.* **2**, 423.
- Heng H.H. & Tsui L.C. (1998) High resolution free chromatin/DNA fiber fluorescent in situ hybridization. *J Chromatogr A*. **8;806**, (1) 219-29.
- Heng H.H., Goetze S., Ye C.J., Liu G., Stevens J.B., Bremer S.W., Wykes S.M., Bode J., & Krawetz S.A. (2004) Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J.Cell Sci.* **117**, 999-1008.
- Holman A.G. & Coffin J.M. (2005) Symmetrical base preferences surrounding HIV-1, avian sarcoma/leukosis virus, and murine leukemia virus integration sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102**, 6103-6107.
- Hozak P., Hassan A.B., Jackson D.A., & Cook P.R. (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell*. **73**, 361-373.

- Isaacs A. & Lindenmann J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc.R.Soc. Lond B Biol.Sci.* **147**, 258-267.
- Izaurralde E., Kas E., & Laemmli U.K. (1989) Highly preferential nucleation of histone H1 assembly on scaffold-associated regions. *J.Mol.Biol.* **210**, 573-585.
- Jackson D.A., Hassan A.B., Errington R.J., & Cook P.R. (1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J.* **12**, 1059-1065.
- Jarman A.P. & Higgs D.R. (1988) Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes. *EMBO J.* **7**, 3337-3344.
- Jenuwein T., Forrester W.C., Fernandez-Herrero L.A., Laible G., Dull M., & Grosschedl R. (1997) Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature.* **385**, 269-272.
- Johnson C.N. & Levy L.S. (2005) Matrix attachment regions as targets for retroviral integration. *Virol.J.* **19**, 68.
- Käs E., Izaurralde E., & Laemmli U.K. (1989) Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histone H1 by distamycin. The role of oligo(dA).oligo(dT) tracts. *J.Mol.Biol.* **210**, 587-599.
- Kay V. & Bode J. (1994) Binding specificity of a nuclear scaffold: supercoiled, single-stranded, and scaffold-attached-region DNA. *Biochemistry.* **33**, 367-374.
- Klar M., Stellamanns E., Ak P., Gluch A., & Bode J. (2005) Dominant genomic structures: detection and potential signal functions in the interferon-beta domain. *Gene.* **364**, 79-89.
- Klar M. & Bode J. (2005) Enhanceosome formation over the beta interferon promoter underlies a remote-control mechanism mediated by YY1 and YY2. *Mol.Cell Biol.* **25**, 10159-10170.
- Klehr D., Maass K., & Bode J. (1991) Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry.* **30**, 1264-1270.
- Klehr D., Schlake T., Maass K., & Bode J. (1992) Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry.* **31**, 3222-3229.

Knopp A. (2000) *Dissertation*: Studien zur Struktur von S/MARs am Beispiel einer genomischen Domäne aus dem humanen Interferon-Gencluster.

Kowalski D., Natale D.A., & Eddy M.J. (1988) Stable DNA unwinding, not "breathing," accounts for single-strand-specific nuclease hypersensitivity of specific A+T-rich sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **85**, 9464-9468.

Kurz A., Lampel S., Nickolenko J.E., Bradl J., Benner A., Zirbel R.M., Cremer T., & Lichter P. (1996) Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J.Cell Biol.* **135**, 1195-1205.

Lamb M.M. & Daneholt B. (1979) Characterization of active transcription units in Balbiani rings of *Chironomus tentans*. *Cell.* **17**, 835-848.

Lamond A.I. & Earnshaw W.C. (1998) Structure and function in the nucleus. *Science.* **280**, 547-553.

Lawrence J.B., Singer R.H., & Marselle L.M. (1989) Highly localized tracks of specific transcripts within interphase nuclei visualized by in situ hybridization. *Cell.* **57**, 493-502.

Lawrence J.B., Carter K.C., & Xing X. (1993) Probing functional organization within the nucleus: is genome structure integrated with RNA metabolism? *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **58**, 807-818.

Lewis C.D., Lebkowski J.S., Daly A.K., & Laemmli U.K. (1984) Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures. *J.Cell Sci.Suppl.* **1**, 103-122.

Li Q., Zhang M., Duan Z., & Stamatoyannopoulos G. (1999) Structural analysis and mapping of DNase I hypersensitivity of HS5 of the beta-globin locus control region. *Genomics.* **61**, 183-193.

Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., & Ward D.C. (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum.Genet.* **80**, 224-234.

Liu L.F. & Wang J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**, 7024-7027.

Luderus M.E., de Graaf A., Mattia E., den Blaauwen J.L., Grande M.A., de Jong L., & van Driel R. (1992) Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell.* **70**, 949-959.

- Ma H., Siegel A.J., & Berezney R. (1999) Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. *J.Cell Biol.* **146**, 531-542.
- Mahy N.L., Perry P.E., & Bickmore W.A. (2002) Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J.Cell Biol.* **159**, 753-763.
- Manuelidis L. (1985) Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Hum.Genet.* **71**, 288-293.
- Marshall E. (2002) Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science.* **298**, 34-35.
- McKnight R.A., Shamay A., Sankaran L., Wall R.J., & Hennighausen L. (1992) Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 6943-6947.
- Michalowski S.M., Allen G.C., Hall G.E., Jr., Thompson W.F., & Spiker S. (1999) Characterization of randomly-obtained matrix attachment regions (MARs) from higher plants. *Biochemistry.* **38**, 12795-12804.
- Mielke C., Kohwi Y., Kohwi-Shigematsu T., & Bode J. (1990) Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: correlation of properties in vitro and function in vivo. *Biochemistry.* **29**, 7475-7485.
- Mielke C., Maass K., Tummler M., & Bode J. (1996) Anatomy of highly expressing chromosomal sites targeted by retroviral vectors. *Biochemistry.* **20;35**, 2239-2252.
- Mielke C., Christensen M.O., Westergaard O., Bode J., Benham C.J., & Breindl M. (2002) Multiple collagen I gene regulatory elements have sites of stress-induced DNA duplex destabilization and nuclear scaffold/matrix association potential. *J.Cell Biochem.* **84**, 484-496.
- Mishra K. & Karch F. (1999) Boundaries that demarcate structural and functional domains of chromatin. *J.Biosci.* **24**, 377-399.
- Mitchell R.S., Beitzel B.F., Schroder A.R., Shinn P., Chen H., Berry C.C., Ecker J.R., & Bushman F.D. (2004) Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS.Biol.* **2**, E234.

- Mooslehner K., Karls U., & Harbers K. (1990) Retroviral integration sites in transgenic Mov mice frequently map in the vicinity of transcribed DNA regions. *J. Virol.* **64**, 3056-3058.
- Nakagomi K., Kohwi Y., Dickinson L.A., & Kohwi-Shigematsu T. (1994) A novel DNA-binding motif in the nuclear matrix attachment DNA-binding protein SATB1. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1852-1860.
- Namciu S.J., Blochlinger K.B., & Fournier R.E. (1998) Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* **18**, 2382-2391.
- Narezkina A., Taganov K.D., Litwin S., Stoyanova R., Hayashi J., Seeger C., Skalka A.M., & Katz R.A. (2004) Genome-wide analyses of avian sarcoma virus integration sites. *J. Virol.* **78**, 11656-11663.
- Nickerson J.A., Krochmalnic G., Wan K.M., & Penman S. (1989) Chromatin architecture and nuclear RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 177-181.
- O'Keefe R.T., Henderson S.C., & Spector D.L. (1992) Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J. Cell Biol.* **116**, 1095-1110.
- Owerbach D., Rutter W.J., Shows T.B., Gray P., Goeddel D.V., & Lawn R.M. (1981) Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3123-3127.
- Palstra R.J., Tolhuis B., Splinter E., Nijmeijer R., Grosveld F., & de Laat W. (2003) The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat. Genet.* **35**, 190-194.
- Patrinos G.P., de Krom M., de Boer E., Langeveld A., Imam A.M., Strouboulis J., de Laat W., & Grosveld F.G. (2004) Multiple interactions between regulatory regions are required to stabilize an active chromatin hub. *Genes Dev.* **18**, 1495-1509.
- Paulson J.R. & Laemmli U.K. (1977) The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell.* **12**, 817-828.
- Pikaart M.J., Recillas-Targa F., & Felsenfeld G. (1998) Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* **12**, 2852-2862.

- Pringle M.N., Nony P., Simpson M., & Felsenfeld G. (1999) An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken beta-globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. *EMBO J.* **18**, 4035-4048.
- Recillas-Targa F., Pikaart M.J., Burgess-Beusse B., Bell A.C., Litt M.D., West A.G., Gaszner M., & Felsenfeld G. (2002) Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**, 6883-6888.
- Renz A. & Fackelmayer F.O. (1996) Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 843-849.
- Richmond T.J. & Davey C.A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature.* **423**, 145-150.
- Roberts R.M., Liu L., Guo Q., Leaman D., & Bixby J. (1998) The evolution of the type I interferons. *J.Interferon Cytokine Res.* **18**, 805-816.
- Robertsen B., Bergan V., Rokenes T., Larsen R., & Albuquerque A. (2003) Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J.Interferon Cytokine Res.* **23**, 601-612.
- Rohdewohld H., Weiher H., Reik W., Jaenisch R., & Breindl M. (1987) Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites. *J.Virol.* **61**, 336-343.
- Romig H., Fackelmayer F.O., Renz A., Ramsperger U., & Richter A. (1992) Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J.* **11**, 3431-3440.
- Saitoh N., Bell A.C., Recillas-Targa F., West A.G., Simpson M., Pikaart M., & Felsenfeld G. (2000) Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken beta-globin domain. *EMBO J.* **19**, 2315-2322.
- Scangos G. & Ruddle F.H. (1981) Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. *Gene.* **14**, 1-10.

- Schardin M., Cremer T., Hager H.D., & Lang M. (1985) Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum.Genet.* **71**, 281-287.
- Scheer U. & Weisenberger D. (1994) The nucleolus. *Curr.Opin.Cell Biol.* **6**, 354-359.
- Scherdin U., Rhodes K., & Breindl M. (1990) Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J.Virol.* **64**, 907-912.
- Scherf M., Klingenhoff A., & Werner T. (2000) Highly specific localization of promoter regions in large genomic sequences by PromoterInspector: a novel context analysis approach. *J.Mol Biol.* **297**, 599-606.
- Schroder A.R., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J.R., & Bushman F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* **110**, 521-529.
- Schubeler D., Mielke C., Maass K., & Bode J. (1996) Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner. *Biochemistry.* **35**, 11160-11169.
- Seibler J., Schubeler D., Fiering S., Groudine M., & Bode J. (1998) DNA cassette exchange in ES cells mediated by Flp recombinase: an efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochemistry.* **37**, 6229-6234.
- Shih C.C., Stoye J.P., & Coffin J.M. (1988) Highly preferred targets for retrovirus integration. *Cell.* **20;53**, 531-537.
- Singh G.B., Kramer J.A., & Krawetz S.A. (1997) Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1419-1425.
- Stewart W.E. (1980) Interferon nomenclature recommendations. *J.Infect.Dis.* **142**, 643.
- Stief A., Winter D.M., Stratling W.H., & Sippel A.E. (1989) A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature.* **341**, 343-345.
- Strouboulis J. & Wolffe A.P. (1996) Functional compartmentalization of the nucleus. *J.Cell Sci.* **109**, 1991-2000.
- Tsao Y.P., Wu H.Y., & Liu L.F. (1989) Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from in vitro studies. *Cell.* **56**, 111-118.

- Tsutsui K. (1998) Synthetic concatemers as artificial MAR: importance of a particular configuration of short AT-tracts for protein recognition. *Gene Ther Mol Biol* **1**, 581-590.
- van Drunen C.M., Sewalt R.G., Oosterling R.W., Weisbeek P.J., Smeekens S.C., & van Driel R. (1999) A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2924-2930.
- van Pesch, V, Lanaya H., Renauld J.C., & Michiels T. (2004) Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J. Virol.* **78**, 8219-8228.
- Vassetzky Y., Hair A., & Mechali M. (2000) Rearrangement of chromatin domains during development in *Xenopus*. *Genes Dev.* **14**, 1541-1552.
- Vidakovic M., Koester M., Goetze S., Winkelmann S., Klar M., Poznanovic G., & Bode J. (2005) Co-localization of PARP-1 and lamin B in the nuclear architecture: a halo-fluorescence- and confocal-microscopy study. *J. Cell Biochem.* **96**, 555-568.
- Vijaya S., Steffen D.L., & Robinson H.L. (1986) Acceptor sites for retroviral integrations map near DNase I-hypersensitive sites in chromatin. *J. Virol.* **60**, 683-692.
- Vogelstein B., Pardoll D.M., & Coffey D.S. (1980) Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. *Cell.* **22**, 79-85.
- Volpi E.V., Chevret E., Jones T., Vatcheva R., Williamson J., Beck S., Campbell R.D., Goldsworthy M., Powis S.H., Ragoussis J., Trowsdale J., & Sheer D. (2000) Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J. Cell Sci.* **113**, 1565-1576.
- Wiegant J., Kalle W., Mullenders L., Brookes S., Hoovers J.M., Dauwerse J.G., van Ommen G.J., & Raap A.K. (1992) High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 587-591.
- Winkelmann S., Klar M., Benham C., Prashanth A., Goetze S., Gluch A., & Bode J. (2006) The positive aspects of stress: strain initiates domain decondensation (SIDDD). *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **5**, 24-31.
- Witkowski J.A. (1988) The discovery of 'split' genes: a scientific revolution. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 110-113.
- Wolffe A.P. (1992) New insights into chromatin function in transcriptional control. *FASEB J.* **6**, 3354-3361.

Wu X., Li Y., Crise B., & Burgess S.M. (2003) Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*. **300**, 1749-1751.

Yokota H., Singer M.J., van den Engh G.J., & Trask B.J. (1997) Regional differences in the compaction of chromatin in human G0/G1 interphase nuclei. *Chromosome.Res.* **5**, 157-166.

Yusufzai T.M. & Felsenfeld G. (2004) The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**, 8620-8624.

Zbarskii I.B. & Debov S.S. (1951) [Protein fractions in the cell nuclei.]. *Biokhimiia*. **16**, 390-395.

Zehnbauer B.A. & Vogelstein B. (1985) Supercoiled loops and the organization of replication and transcription in eukaryotes. *BioEssays* **2**, 52-54.

Zhao K., Kas E., Gonzalez E., & Laemmli U.K. (1993) SAR-dependent mobilization of histone H1 by HMG-I/Y in vitro: HMG-I/Y is enriched in H1-depleted chromatin. *EMBO J.* **12**, 3237-3247.

Zorn C., Cremer T., Cremer C., & Zimmer J. (1976) Laser UV microirradiation of interphase nuclei and post-treatment with caffeine. A new approach to establish the arrangement of interphase chromosomes. *Hum.Genet.* **35**, 83-89.

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Epigenetische Regulationsmechanismen im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Bode angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode möchte ich für die Bereitstellung des Themas, für das stete Interesse an meiner Arbeit, seine motivierende Begeisterung und für seine Mühen bei der Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für das Koreferat und dafür, dass er zusammen mit Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode die Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der technischen Universität Braunschweig vertritt. Auch Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel danke ich für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Großer Dank gilt auch allen Kooperationspartnern (Craig Benham und Prashanth AK, UC Davis Genome Center; Roderic McLeod und Maren Kaufmann, DSMZ; Ulrike Sauermann, DPZ; Manfred Wirth, HZI und Manfred Schmidt, Uni Freiburg) für die bereitwillige Bereitstellung von Arbeitsmaterialien, für die Hilfe beim Erlernen von Arbeitstechniken und für die Unterstützung beim Auswerten und Analysieren von Daten.

Danke an all meine Kollegen in der Arbeitsgruppe RDIF, insbesondere den EPIs! Kristina Nehlsen, Melita Vidakovic, André Oumard, Roland Schucht, Martin Klar, Martina Grashoff, Karin Maass, und Sandra Götze gilt mein besonderer Dank für das hervorragende Arbeitsklima. Es war eine gute Zeit und ich konnte jederzeit mit eurer Hilfe und Unterstützung rechnen.

Ein riesengroßes Dankeschön an alle, die mich während meiner Zeit am HZI (vor allem in der Endphase) immer wieder aufgemuntert und ermutigt haben. Insbesondere danke ich meiner Mutter und meinen Geschwistern – sie haben mir immer den nötigen Halt gegeben.

8. Lebenslauf

Persönliche Information

- Silke Winkelmann
- Geburtsdatum: 14.03.1974
- Geburtsort: Stadthagen
- Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1980 – 1984	Grundschule Leese
1984 – 1986	Orientierungsstufe Stolzenau
1986 – 1993	Gymnasium Stolzenau
Mai 1993	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung / Studium / Beruf

08/1993-06/1995	Ausbildung zur Industriekauffrau Bremskerl Reibbelagwerke Emmerling & Co.KG, 31629 Estorf-Leeseringen Abschluss: IHK-Prüfung
06/1995-10/1996	Sachbearbeiterin im Verkauf Bremskerl Reibbelagwerke Emmerling & Co.KG, 31629 Estorf-Leeseringen
10/1996-03/2002	Studium Biologie Universität Hannover Abschluss: Diplom Note: sehr gut Thema: Vergleichende Untersuchungen zur Anwendung von rRNA- und Hox-Gen-Merkmalen für Stammbaumrekonstruktionen innerhalb der Hydrozoa (Cnidaria).
03/2002-05/2002	Wissenschaftliche Hilfskraft Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Tierökologie und Zellbiologie, 30559 Hannover

- 06/2002-08/2002 **Gastaufenthalt, USA**
Yale University, Dept. Molecular, Cellular & Developmental
Biology, New Haven
- 10/2002-11/2002 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Teilzeit)**
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut
für Pflanzen-virologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit,
38104 Braunschweig
- 04/2003-04/2006 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin**
GBF - Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abt.
Epigenetische Regulationsmechanismen, 38124 Braunschweig

Veröffentlichungen & Tagungsbeiträge

Collins, A. G., Winkelmann, S., Hadrys, H. & Schierwater, B. (2004). Phylogeny of Capitata (Cnidaria, Hydrozoa) and Corynidae (Capitata) in light of mitochondrial 16S rDNA data. *Zoologica Scripta*, Vol. 34, 91-99

S. Winkelmann, A. Ender, P. Schuchert & B. Schierwater. Species-level systematics of the Corynidae (Cnidaria, Hydrozoa) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *DZG-Jahrestagung*, 20.-24. Mai 2002, Halle (Poster)